

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA COMBINACIÓN DE
UNA VACUNA DE ADN CONTRA WT1 Y GEMCITABINA
EN UN MODELO MURINO DE MELANOMA

Por

VICTOR HUGO MONTOYA URZÚA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Acentuación en Inmunobiología

Mayo, 2016

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA COMBINACIÓN DE
UNA VACUNA DE ADN CONTRA WT1 Y GEMCITABINA
EN UN MODELO MURINO DE MELANOMA

Comité de tesis

Dr. Pablo Zapata Benavides
Presidente

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Secretario

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal

Dra. Laura María Trejo Ávila
Vocal

Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides, por haberme aceptado en su laboratorio y por su paciencia y apoyo a lo largo de la realización de este proyecto.

Al M.C. Edgar Manilla Muñoz, por su espíritu de servicio, por toda su ayuda desde el primer día que llegué a posgrado hasta ahora.

A mis maestros, por compartir sus ideas y conocimientos.

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Pablo Zapata Benavides.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
JUSTIFICACIÓN	4
ANTECEDENTES	5
Cáncer de piel	5
Melanoma maligno.	5
Epidemiología.	6
Factores de riesgo.	7
Subtipos clínico-patológicos.....	8
Diagnóstico.	9
Estadificación y pronóstico.....	12
Tratamiento.	15
Vacunas en cáncer	17
Vacunas de células tumorales.	17
Vacunas de antígenos purificados no proteicos.....	18
Vacunas de proteínas/péptidos específicos.....	18
Vacunas de vectores virales	19
Vacunas de células dendríticas o de apc profesionales.....	19
Vacunas de ADN.	20
Gemcitabina	22
Farmacología celular, metabolismo y mecanismo de acción.	22

Mecanismos de resistencia.....	26
Datos farmacocinéticos.....	26
Toxicidad.....	27
Sensibilización a la radiación.....	28
Gen del tumor de wilms (<i>WT1</i>).....	29
Estructura de <i>WT1</i>	31
<i>WT1</i> en cáncer.....	32
<i>WT1</i> en melanoma.....	33
HIPÓTESIS	35
OBJETIVO GENERAL	35
Objetivos particulares.....	35
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
MATERIALES Y METODOLOGIA	37
Línea celular y animales	37
Determinación de viabilidad y proliferación en células B16F10 tratadas con GEM (DL ₅₀ de GEM)	37
Extracción y cuantificación de proteínas	38
Western blot	38
Transformación y Producción a gran escala del plásmido <i>WT1</i> H+/-	40
Purificación del plásmido	41
Transfección del plásmido en la línea celular B16F10	41
Establecimiento de tumor subcutáneo con células B16F10	41
Dot Blot para la medición de anticuerpos específicos para <i>WT1</i> en suero	41
Esquema de tratamientos para evaluación de respuesta antitumoral.....	42
Obtención del índice tumoral	43
Prueba de supervivencia	43

Análisis estadístico.....	43
RESULTADOS.....	44
Proliferación de células B16F10 tratadas con GEM y determinación de $DL_{(50)}$	44
Modulación de la expresión de <i>WT1</i> por la GEM.	45
Caracterización funcional del plásmido y producción para su uso como vacuna.....	46
Detección de anticuerpos contra WT1.....	48
Cálculo del índice tumoral y monitoreo del peso de los ratones	48
Análisis de supervivencia	51
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	58
PERSPECTIVAS	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60
RESUMEN BIOGRÁFICO	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de clasificación TNM para melanoma maligno	13
Tabla 2. Rangos de supervivencia a 5 años para pacientes con melanoma..	14
Tabla 3. Genes que son blancos transcripcionales de WT1	30
Tabla 4. Concentración de plásmido con la secuencia de <i>WT1</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Rutas de presentación de antígenos y activación de linfocitos B y T en la vacunación con ADN	21
Fig. 2. Estructura de moléculas análogas de citidina	23
Fig. 3. Pasos clave en el metabolismo de la GEM y función asociada al metabolito producido	25
Fig. 4. Estructura del gen <i>WT1</i>	31
Fig. 5. Esquema de tratamientos	42
Fig. 6. Análisis de viabilidad de células B16F10 tratadas con GEM.....	44
Fig. 7. Proliferación de células B16F10 tratadas con GEM.....	45
Fig. 8. Análisis de la modulación de WT1 por parte de la GEM.....	46
Fig. 9. Sobreexpresión de WT1 en células transfectadas con 4 µg de plásmido	48
Fig. 10. Detección de anticuerpos específicos contra WT1	49
Fig. 11. Monitoreo del peso de los ratones y del volumen tumoral	50
Fig. 12. Cinética de peso promedio de los ratones de cada grupo	51
Fig. 13. Monitoreo de la pérdida o ganancia del peso de ratones	52
Fig. 14. Curva de supervivencia de los ratones de cada grupo	53

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

µg	Microgramo
µL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CDK4	Kinasa dependiente de ciclina 4
DL ₅₀	Dosis letal media
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTIC	Dacarbazina
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
GEM	Gemcitabina
HRP	Peroxidasa de rábano
i.p.	Intraperitoneal
M	Molar
mM	Milimolar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEI	Polietilenimina
s.c.	Subcutáneo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAA _s	Antígenos asociados a tumor
TBS	Buffer Tris Salino
TNM	Tamaño, Nódulos y Metástasis
V	Volts
WT1	Gen del tumor de Wilms
WT1	Proteína del tumor de Wilms

RESUMEN

Introducción: El melanoma maligno es una de las neoplasias más letales y en los últimos años ha habido un aumento alarmante en su prevalencia, sin que actualmente se conozcan terapias efectivas que resulten en una mayor supervivencia de los pacientes con enfermedad avanzada. La proteína del tumor de Wilms (WT1) es reconocida por desempeñar un rol oncogénico en diversos tumores hematológicos y sólidos, incluyendo melanoma. La GEM es un agente quimioterapéutico análogo de nucleótido que inhibe la síntesis de ADN y se ha demostrado que regula positivamente la expresión de *WT1*. **Objetivo:** Determinar si existe un efecto sinérgico entre el tratamiento simultáneo con una vacuna de ADN basada en WT1 (vWT1) y GEM. **Metodología:** *In vitro* se determinó la $DL_{(50)}$ y se analizó el efecto de la GEM sobre la proliferación de células B16F10, así como el efecto de la GEM en la expresión de WT1 y se caracterizó la funcionalidad de vWT1. *In vivo* se analizó la producción de anticuerpos inducida por la vacunación y posteriormente se indujeron tumores subcutáneos con 5×10^5 células, formando 4 grupos experimentales con 5 ratones cada uno: a) control sin tratamiento, b) GEM120vWT1, c) GEM10vWT1 y d) GEM120 y finalmente se calculó el índice tumoral y la supervivencia para todos los grupos. **Resultados:** La $DL_{(50)}$ de GEM fue de 32 ng/ml, la dosis de 10 ng/ml indujo mayor proliferación celular a 48 h, mientras que dosis mayores a 50 ng/ml disminuyeron la proliferación celular hasta el 20%. Se observó que la GEM modula de manera negativa la expresión de WT1. En células B16F10 transfectadas con vWT1 se obtuvo una sobreexpresión de WT1 7 veces mayor que en células sin transfectar. Por otro lado se detectaron anticuerpos IgG específicos en ratones inmunizados con vWT1. El índice tumoral fue menor en ratones tratados con 120 mg/kg de GEM solo y la combinación con vWT1 (1µg), mientras que la mayor supervivencia ocurrió en ratones que recibieron la dosis de 10 mg/kg más vWT1. **Conclusiones:** La vacunación contra WT1 más el uso de GEM en melanoma no mostró un efecto antitumoral sinérgico, evidenciando la poca inmunogenicidad del modelo empleado, aunque la combinación de ambas terapias sí tuvo un impacto en la supervivencia al emplear una baja dosis de GEM, a pesar del volumen tumoral.

ABSTRACT

Introduction: Malignant melanoma is one of the deadliest types of cancer. There has been an alarming increment of its prevalence, with no effective therapy resulting in improved survival of patients with advanced stage disease. Wilms' Tumor protein (WT1) has been recognized for carrying out an oncogenic role in several hematological and solid tumors including melanoma. Gemcitabine (GEM), a cytidine analog that inhibits DNA synthesis, has been proved to positively regulate *WT1*. **Objective:** To prove whether a synergic effect is obtained with the combination of a WT1 based DNA vaccine (vWT1) and GEM treatments. **Method:** *In vitro* $DL_{(50)}$ and GEM's effect on proliferation of B16F10 cells was determined, as well as the effect on WT1 expression and vWT1 functionality. *In vivo* vWT1 induced-antibody production was analyzed. Afterwards, subcutaneous tumors were established with 5×10^5 cells. Four experimental groups were formed with 5 mice each: a) Control group, b) GEM120vWT1, c) GEM10vWT1 and d) GEM120. Finally, tumor volume and survival was assessed for all groups. **Results:** $LD_{(50)}$ was 32 ng/ml. Augmented proliferation was promoted with the dose of 10 ng/ml at 48 h while doses higher than 50 ng/ml reduced proliferation to 20 %. A GEM-induced negative modulation of WT1 expression was observed. In vWT1-transfected B16F10 cells there was an over expression of WT1 that was 7 times that of control non-transfected cells. IgG type antibodies specific for WT1 were detected in mice immunized with vWT1. Tumor volume was lower in mice treated with GEM120 and GEM120vWT1 but it was in mice treated with GEM10vWT1 where enhanced survival was detected. **Conclusions:** The treatment with vWT1 immunization along with GEM did not prove to have a synergic effect in melanoma, giving evidence of the poor immunogenicity of the model; however, this combination did have an impact on survival when using a low dose of GEM, notwithstanding tumor volume.

INTRODUCCIÓN

El melanoma maligno constituye el cáncer de piel más agresivo y potencialmente letal, lo cual se asocia a su elevada capacidad para dar metástasis a distancia. Afecta predominantemente a adultos en edad productiva y se estima que su incidencia se duplica cada 10 a 20 años, afectando principalmente a poblaciones de piel clara. Los tratamientos convencionales (en particular la quimioterapia) han mostrado poca efectividad y elevada toxicidad en la mayoría de los pacientes.

Las vacunas de ADN en cáncer, constituyen una novedosa estrategia inmunoterapéutica y tienen como objetivo estimular o potenciar en el huésped una respuesta inmunitaria contra los antígenos del tumor, además induce menos efectos secundarios y evita la metástasis y recurrencia, en comparación con las terapias estándar.

Avances recientes han resultado en la identificación de un gran número de antígenos asociados a tumor (TAAs) y sus epítopes reconocidos por linfocitos T citotóxicos, de varios tipos de neoplasias malignas. Uno de los antígenos asociados a tumor que ha sido identificado es el producto del gen *WT1* el cual es considerado un antígeno tumoral universal. El gen *WT1* codifica para un factor de transcripción involucrado en proliferación y diferenciación celular y apoptosis. Mediante la modulación de la expresión de genes asociados a estos procesos se ha demostrado una sobreexpresión de *WT1* en distintas neoplasias, desde leucemias hasta tumores sólidos de mama, pulmón, ovario, útero, tiroides, melanoma etc., lo cual ha sugerido que desempeña un relevante papel oncogénico.

La finalidad de este trabajo es determinar si la combinación de una vacuna de ADN contra WT1 mas GEM produce un efecto antitumoral sinérgico más eficiente que uno u otro tratamiento por sí solo, ya que los mecanismos de acción de ambos agentes promueven la cooperación entre éstos.

JUSTIFICACIÓN

El poco éxito de las terapias convencionales contra formas avanzadas de melanoma, indica la necesidad de buscar tratamientos más efectivos y menos tóxicos para los pacientes, el principal propósito es lograr un aumento en la sobrevivencia de los pacientes; los esfuerzos más recientes se centran en el desarrollo de terapia génica e inmunoterapia contra blancos específicos. El gen del tumor de Wilms (WT1) fue recientemente reconocido como un antígeno tumoral universal y el más importante para el desarrollo de vacunas contra el cáncer, de un listado de 75 antígenos. La Gemcitabina (GEM) es un agente quimioterapéutico muy utilizado para el tratamiento de adenocarcinomas y algunos tipos de leucemias y además de su función citotóxica *per se* tiene la capacidad de potencializar la respuesta inmune a través de diversos mecanismos, lo que sugiere su empleo en combinación con inmunoterapia en cáncer. En el presente trabajo se ensayará la hipótesis de que el tratamiento combinado de GEM junto con una vacuna de ADN contra WT1 produce un sinergismo en la respuesta antitumoral, calidad de vida y sobrevivencia. Los resultados que se obtengan podrían aplicarse a otros modelos de células tumorales que expresen WT1.

ANTECEDENTES

Cáncer de piel

El cáncer engloba un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y diseminación de células anormales en el cuerpo y representa un problema de salud pública alarmante que ha ido en aumento, con incidencias que alcanzan anualmente 10 millones de casos en el mundo, con una mortalidad mayor a 6 millones de casos cada año (Stewart y Kleihues, 2003).

El cáncer de piel incluye un conjunto de neoplasias con muy diversas características, tanto por su origen como por sus factores de riesgo y pronóstico, distinguiéndose dos grupos principales: el grupo Melanoma maligno y el grupo de cáncer cutáneo No melanoma, que abarca esencialmente los carcinomas Espinocelulares y Basocelulares (Martínez y Otley, 2001).

En nuestro país, el cáncer de piel se halla en el segundo lugar de frecuencia, de acuerdo con un informe emitido en 2001 por el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Para las mujeres representa el segundo sitio de frecuencia y para los varones el primero (Secretaría de Salud, 2001).

Melanoma maligno.

En los últimos años ha aumentado enormemente el interés por el melanoma maligno, el cáncer de piel más agresivo y potencialmente letal.

El melanoma es un tumor que deriva de la proliferación de melanocitos atípicos, con capacidad o no para producir pigmento. Afecta principalmente la piel (90%), pero también puede localizarse en uvea e iris (9%) y con menor frecuencia en mucosas y meninges, siendo su principal característica una elevada capacidad de dar metástasis, la cual puede ocurrir por la vía linfática a tejidos vecinos o por la vía hemática a vísceras, principalmente a pulmón e hígado (Austoker, 1994; Denninghoff, y *col.*, 2006).

Epidemiología.

El melanoma afecta predominantemente a adultos en edad productiva, no obstante su aparición en infantes se relaciona con un nevo melanocítico congénito gigante, el síndrome de nevos displásicos o la enfermedad genética xeroderma pigmentoso. En el sexo masculino, la enfermedad se presenta muy frecuentemente en tronco, mientras en el sexo femenino suele manifestarse en extremidades inferiores (Goldstein y Goldstein, 2001).

El número de casos de melanoma se ha incrementado más rápido que cualquier otro cáncer. El crecimiento anual en la incidencia muestra variabilidad según las distintas poblaciones, pero en general fluctúa entre 3 a 7 % por año para personas caucásicas.

Se estima que esta enfermedad se duplica cada 10 a 20 años y se manifiesta con mayor preferencia en personas de piel clara, quienes son más sensibles a los rayos solares, sin embargo puede darse en cualquier grupo étnico; el lugar que presenta la más alta incidencia de este tumor es Auckland, Nueva Zelanda, mientras que las cifras más bajas se dan en poblaciones asiáticas: China, India, Japón y Singapur (Leitner, 2006).

En el año 2000, la incidencia de melanoma en el mundo fue de 2.4 por 100,000 para hombres y 2.21 por 100,000 para mujeres, produciéndose en los países desarrollados alrededor de 100,000 nuevos casos, lo que representa un 7-8% de todos los cánceres, mientras la mortalidad en el mismo año fue de aproximadamente 0.75 por 100,000 en varones y de 0.56 por 100,000 en féminas (Desmond y Soong, 2003; Walsh y col., 2000).

En los últimos 30 años, se ha registrado en varias partes del mundo un aumento de esta neoplasia de hasta 400% (Jemal y col., 2004). En Latinoamérica no existen estadísticas fidedignas sobre la incidencia de melanoma, pero estimaciones de la *Internacional Agency for Research on Cancer*, arrojan cifras que ubican a México en una incidencia de 2 por 100,000 habitantes (International Agency for Research on Cancer, 2002) y, la Clínica de Melanoma del Instituto Nacional de

Cancerología aporta evidencia de un desarrollo de casi 500% en años recientes (Martínez-Saíd y col., 2004).

En contraste con otras neoplasias de detección temprana, incluyendo cáncer de mama, próstata, colo-rectal y cáncer cervical, el rango de mortalidad por melanoma en los Estados Unidos mostró un incremento del 29 % de 1975 al 2000 (Ries y col., 2003).

La *American Cancer Society* estima que tan solo este año habrá en los Estados Unidos más de un millón de nuevos casos de cáncer no melanoma, contra 62, 480 nuevos casos de melanoma y calcula que se registrarán un promedio de 2,780 defunciones al año por cáncer de piel no epitelial y 8,420 muertes por melanoma (American Cancer Society, 2008).

Factores de riesgo.

Debido a que la etiología del melanoma es muy compleja, se siguen investigando factores que podrían estar asociados con su aparición y desarrollo, entre los que se hallan factores ambientales, así como otros dependientes del huésped, principalmente de tipo genético.

La literatura (Schaffer y col., 2004; Greene, 1999; MacKie, 1998; Kraehn y col., 1994) destaca los siguientes como factores de riesgo asociados a melanoma:

- Piel clara.* Los caucásicos presentan incremento de hasta 10 veces en incidencia de melanoma comparado con personas de raza negra, y de 7 veces en contraste con poblaciones indígenas y criollas de Latinoamérica. El cabello rojizo, las efélides y otros indicadores de daño solar, aumentan el riesgo 3 veces.

- Presencia de más de 50 nevos melanocíticos y/o nevos displásicos.*

- Antecedente familiar o personal de melanoma.* Entre 6-12% de los melanomas se desarrollan en este contexto.

- Exposición intermitente e intensa a las radiaciones ultravioletas,* particularmente en edades tempranas.

- Otros factores geográficos,* como la latitud geográfica, altitud sobre el nivel del mar o época de año, pues influyen en la intensidad de los rayos solares.

-*Síndromes hereditarios raros* como el albinismo, xeroderma pigmentoso, síndrome de Li-Fraumeni.

-*El status socioeconómico y el nivel de educación* (Rodríguez García y col., 2001).

El 50% de los melanomas se originan de novo, no obstante se consideran lesiones precursoras: nevos melanocíticos congénitos gigantes, nevos displásicos y nevos melanocíticos adquiridos (Tannous y col, 2005).

Análisis genéticos en familias con síndrome de nevos displásicos han llevado a la identificación de genes relacionados con la aparición del melanoma.

Diferentes autores coinciden en que alrededor del 20-40% de las familias con antecedentes de múltiples casos de melanoma, presentan alteraciones en el gen del inhibidor de la cinasa dependiente de la ciclina 2A (CDKN2A). Dichas mutaciones permiten que las células superen el punto de revisión en G1/S, dando como resultado proliferación y crecimiento descontrolado de las mismas (Piepkorn, 2000; Puig y col., 2005); también se han encontrado alteraciones en p53 (Greene, 1999).

Se han descrito mutaciones en el gen INK4A en 8% de pacientes con melanomas primarios múltiples (Heymann, 2004).

Algunas familias presentan mutaciones en la proteína cinasa 4 (CDK4), que es el compañero de unión de p16 (Tsao y Niendorf, 2004).

Por otra parte se han reportado mutaciones en otros genes implicados en casos esporádicos de melanoma, como son: NRAS, BRAF y PTEN/MMAC1 (Tsao y col., 2004).

Subtipos clínico-patológicos.

La mayoría de melanomas presentan una proliferación de melanocitos intraepidérmica, con fases de *crecimiento radial* (sin potencial metastásico) y fases de *crecimiento vertical* (potencialmente metastásico), y del predominio de cada una de éstas dependerá el tipo de melanoma (Liu y Mihm, 2003).

En 1969, Clark y *col* sugirieron la tipificación de las lesiones combinando sus características clínicas y patológicas y las clasificaron en melanoma de extensión superficial, léntigo maligno y nodular; y en 1975, Reed introduce el término melanoma lentiginoso acral.

A continuación se hace una breve descripción de las cuatro formas clínicas señaladas (Goldstein y Goldstein, 2001):

1.- *Melanoma de extensión superficial*: Representa el 70% de todos los melanomas en el mundo. Presenta crecimiento horizontal por un tiempo variable, antes de volverse invasivo.

2.- *Melanoma léntigo maligno*: Representa aproximadamente el 5% de los melanomas. Muestra una firme asociación con una exposición solar constante. Afecta con más frecuencia a personas mayores de 60 años. Su evolución es larga antes de presentar crecimiento vertical y metástasis.

3.- *Melanoma nodular*: A nivel mundial es la segunda forma predominante, con un 10-15% de todos los casos; presenta crecimiento vertical desde un inicio y es rápidamente invasivo.

4.- *Melanoma lentiginoso acral*: Constituye el 8% de estos tumores en el mundo; es el melanoma más común en personas de piel oscura, en el que predomina la forma de extensión radial y se suele presentarse en palmas, plantas, lecho ungueal, mucosas y pene. Cuando se manifiesta en mucosas es de mal pronóstico, dado el rápido acceso a la circulación linfática.

También se han descrito las siguientes variedades de melanoma: amelanico (Goldstein y Goldstein, 2001), desmoplásico (Liu y Mihm, 2003), congénito (Richardson y *col.*, 2002) y de mucosas (Tomicic y Wanebo, 2003).

Diagnóstico.

El diagnóstico de melanoma se da en primer lugar por sospecha clínica, seguido por la dermatoscopia y otros métodos diagnósticos no invasivos, pero solo se

puede confirmar por medio de la Histopatología. Por lo anterior, conviene dividir el diagnóstico en dos apartados: Diagnóstico Clínico y Diagnóstico Histológico.

- Diagnóstico Clínico

Un aspecto fundamental es el diagnóstico preciso y precoz de melanoma; éste puede comenzar con una detallada exploración física que permita determinar el número total de nevos, detectando aquellos con características clínicas sugestivas de malignidad.

Clásicamente, se emplea la regla del *ABCD*, la cual describe la mayor parte de las características clínicas de los melanomas, incluyendo lesiones pigmentadas con *Asimetría*, *Bordes* irregulares, cambios de *Color* y *Diámetro* mayor a 6 mm; no obstante, esta regla no resulta fiable en el diagnóstico de melanoma en etapas iniciales, pues las lesiones pueden medir menos de 6 mm, ser simétricas y de bordes regulares. Adicionalmente, el prurito, la ulceración y el sangrado en una lesión pigmentada son signos de alerta (Goldstein y Goldstein, 2001). Algunos autores incluyen la letra *E*, de *Evolución* o *Elevación*.

Se sabe que la acertividad diagnóstica del melanoma con el examen clínico es de aproximadamente 60% (Grin y col., 1990).

El diagnóstico diferencial se debe plantear principalmente con nevos melanocíticos atípicos, y con otras lesiones como son: nevos traumatizados o irritados, léntigo actínico, nevo azul, queratosis seborréica, carcinoma basocelular pigmentado, angioqueratoma, hematoma, lago venoso, hemangioma, dermatofibroma y queratosis actínica pigmentada (Goldstein y Goldstein, 2001).

La dermatoscopia ha aumentado la capacidad de diagnosticar correctamente lesiones pigmentadas en un 10 a un 20% y es útil, particularmente en la diferenciación del melanoma de las lesiones pigmentadas no melanocíticas, con una sensibilidad que va desde un 60 hasta un 95% dependiendo del grado de experiencia del observador, de la dificultad diagnóstica de la lesión y de los criterios dermatoscópicos utilizados, etc. (Grin y col., 1990).

- Diagnóstico Histológico

Puesto que el melanoma es curable cuando se diagnostica precozmente, es importante realizar una biopsia de las lesiones pigmentadas con características clínicas sospechosas, para su estudio histopatológico.

Se reconocen dos tipos de biopsias: escisional e incisional (Swanson y *col.*, 2002). La biopsia escisional con un margen de 1 a 2 mm es la más recomendada, puesto que extirpa la lesión totalmente y permite su análisis completo. No obstante, antes de realizar la biopsia deben examinarse los ganglios regionales, pues en caso de tratarse de un melanoma, la inflamación reactiva de los ganglios puede resultar en falsos positivos. La biopsia debe orientarse en sentido de drenaje linfático y, en lo posible, siguiendo las líneas de tensión de la piel. La biopsia incisional se puede realizar en lesiones grandes sospechosas, tomándose la muestra de la zona más pigmentada o de la zona más elevada. Se ha comprobado que este procedimiento no aumenta el riesgo de extensión local o recurrencia de melanoma, no obstante puede caerse en errores diagnósticos en caso de que la muestra no sea tomada del sitio adecuado.

La exploración y evaluación del estado de los ganglios linfáticos en el estudio patológico es el factor pronóstico más importante en los pacientes con melanoma (Brady, 2004); el ultrasonido de los ganglios puede aumentar la sensibilidad (de 85.4% hasta 99.1%) en el diagnóstico de metástasis ganglionares (Saiag y *col.*, 2005).

En la actualidad, la biopsia del ganglio centinela se considera apropiada para los pacientes sin ganglios palpables y para aquellos con tumores de grosor igual o superior a 1 mm, ulcerados, con nivel de Clark IV-V, datos de regresión, biopsia por rasurado e incongruencia clínica con el Breslow reportado (Dubois y *col.*, 2005).

También se ha empleado inmunohistoquímica para el diagnóstico de melanoma, siendo los principales marcadores utilizados el S100 y el HMB-45, aunado a otros marcadores tales como antígenos de diferenciación melanocítica (MelanA/MAET1, MITF y tirosinasa) y marcadores de proliferación celular (Ki-67) (Schaffer y *col.*, 2004; Brady, 2004).

Los niveles séricos de la proteína S100 y lactato deshidrogenasa se consideran marcadores de carga tumoral en pacientes con enfermedad avanzada (Schaffer y *col.*, 2004).

Estadificación y pronóstico.

Los esquemas de clasificación y estadificación en cáncer son de mucha utilidad, ya que permiten identificar a aquellos pacientes que presentan un alto riesgo de presentar enfermedad avanzada, comparar opciones de tratamiento, recomendar las terapias más adecuadas, así como ofrecer información pronóstica al paciente.

Al igual que en la mayoría de las neoplasias malignas, en melanoma los factores pronósticos a nivel histológico se agrupan en dos metodologías principales: *Índice de Breslow* y *niveles de Clark*.

El índice de Breslow es considerado el indicador pronóstico más útil. Se basa en la medición del grosor del melanoma; por regla general, entre más delgada sea la lesión, mejor será el pronóstico del paciente, quedando establecidos los siguientes criterios (Ferrándiz, 2001):

- Bajo riesgo.- melanomas de espesor menor de 1.5 mm.
- Riesgo moderado.- melanomas de entre 1.5 y 4 mm de grosor.
- Riesgo elevado.- melanomas de más de 4 mm de espesor.

Los niveles de Clark (Clark y *col.*, 1969) permiten establecer el grado de compromiso vertical existente, siendo éstos:

- I.- Intraepidérmico
- II.- Zona de unión dermo-epidérmica
- III.- Dermis papilar
- IV.- Dermis reticular
- V.- Tejido subcutáneo

Se utiliza con mucha frecuencia el sistema TNM, oficializado en 2002 por el *American Joint Committee on Cancer -AJCC-* para describir la extensión anatómica de distintas neoplasias. La letra T se refiere al espesor del tumor, la N al número de ganglios regionales cercanos que se hallan afectados y la M a presencia de metástasis a distancia. Para melanoma, el sistema TNM agrupa en general los estadios 0, I, II, III y IV (Tabla 1) (Balch y *col.*, 2001).

Tabla 1. Sistema de clasificación TNM para melanoma maligno.	
ESTADIO	DESCRIPCIÓN
O	Melanoma in situ, sin metástasis a nodos linfáticos, sin metástasis a distancia.
IA	Tumor de 1mm o menos de espesor, nivel II o III de Clark sin ulceración, sin metástasis a nodos linfáticos, sin metástasis a distancia.
IB	Tumor de 1 mm o menos de espesor, nivel IV o V de Clark o con ulceración o lesión de más de 1 mm pero menos de 2 mm de grosor sin ulceración, en ambos casos sin metástasis a nodos linfáticos y sin metástasis a distancia.
IIA	Tumor de más de 1 mm pero menos de 2 mm de grosor con ulceración o melanoma de más de 2 mm pero menos de 4 mm de grosor sin ulceración, en ambos casos sin metástasis a nodos linfáticos y sin metástasis a distancia.
IIB	Tumor de más de 2 mm pero menos de 4 mm de grosor con ulceración o lesión de más de 4 mm de espesor sin ulceración, en ambos casos sin metástasis a nodos linfáticos y no hay metástasis a distancia.
IIC	Tumor de más de 4 mm de espesor con ulceración, sin metástasis a nodos linfáticos ni metástasis a distancia.
III	Para todos los casos cualquier espesor de tumor. a) Metástasis a un solo nodo linfático; b) Metástasis a dos o tres nodos regionales o metástasis regional intralinfática sin metástasis nodal; c) Metástasis a más de cuatro nodos regionales, o nódulos linfáticos enmarañados, o metástasis en tránsito o satélite con nodos regionales metastáticos. Para ningún inciso se presenta metástasis a distancia.
IV	Cualquier grosor de tumor, cualquier número de ganglios regionales metastáticos, con metástasis distante.

A continuación se muestran los rangos de supervivencia de pacientes a cinco años, según estadio y presencia o no de ulceraciones (Tabla 2).

Tabla 2. Rangos de supervivencia a 5 años para pacientes con melanoma.		
	Tumor no ulcerado	Tumor ulcerado
IA	95%	-
IB	89%	91%
IIA	79%	77%
IIB	67%	63%
IIC	-	45%
IIIA	67%	-
IIIB	54%	52%
IIIC	28%	24%

En cuanto al estadio IV, debido a que se presenta metástasis a distancia, se han formado tres categorías, de acuerdo al sitio de afectación, las cuales son: M1a (piel, tejido subcutáneo y nodos linfáticos), M1b (pulmón) y M1c (otras vísceras); los rangos de supervivencia a un año se han estimado en 59% para M1a, 57% para M1b y 41% para M1c (Balch y *col.*, 2001).

Se ha establecido que el ser hombre y presentar melanoma en tronco implica un peor pronóstico, además se considera que el subtipo clínico léntigo maligno es el de mejor pronóstico y si se trata en fase de extensión radial la mortalidad es prácticamente nula.

Asimismo se ha observado un mal pronóstico en casos con invasión tumoral de vasos en la biopsia, y peor aun en melanomas con ulceraciones y en aquellos con elevado índice mitótico (Ferrándiz, 2001).

Tratamiento.

La escisión quirúrgica en etapas tempranas es, sin duda, la terapia más efectiva en el manejo de melanoma maligno (Zitelli y *col.*, 1997).

Desafortunadamente muchos de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas, lo cual ha llevado a la búsqueda y desarrollo de diversas modalidades de tratamiento, pero a pesar de numerosos esfuerzos ensayando combinaciones con terapias existentes, no se ha logrado incrementar la sobrevida de los pacientes en forma significativa.

Las opciones de tratamiento y los intervalos de respuesta para pacientes con melanoma varían, según la profundidad de la lesión primaria y el estadio en que se halle el tumor.

En general, las estrategias terapéuticas contra esta neoplasia incluyen, además de la cirugía: radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y combinaciones entre éstas.

Desde hace varias décadas se reconoció la relativa resistencia del melanoma a la radioterapia; no obstante, en la actualidad se indica su uso en pacientes con elevado riesgo de recurrencia, como terapia adyuvante enfocada al sitio de tumor primario. Las indicaciones son: melanoma de cabeza y cuello, melanoma primario profundo o ulcerado, recurrencia local y metástasis cutáneas, subcutáneas y ganglionares (Ballo y Ang, 2003).

Respecto a la quimioterapia, ha resultado ineficaz para el tratamiento de melanoma metastásico, siendo la dacarbazina (DTIC) la única droga aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) para combatir estadios avanzados del tumor, con rangos de respuesta de 10-20%, pero sin mejoras en la supervivencia a 5 años (Legha, 1989; Anderson, y *col.*, 1995).

Los escasos resultados obtenidos con quimioterapia con único agente, incluyendo además de dacarbazina compuestos de platino, vinca alcaloides, nitrosureas, taxanos, etc., llevaron al desarrollo de la poliquimioterapia, ensayando combinaciones como el BOLD (bleomicina, vincristina, CCNU, DTIC), CVD (cisplatino, vinblastina y DTIC) y el esquema Darmouth o CBDT (cisplatino, BCNU, DTIC y tamoxifeno), obteniendo rangos de respuesta de 30-50%, con efectos de

corta duración, elevada toxicidad y sin aumento en la supervivencia de los pacientes (O'Day y col., 2002).

Varios estudios *in vitro* han reportado la presencia de receptores estrogénicos en células de melanoma derivadas de tumores metastásicos (Fisher y col., 1976; Walker y col., 1987), por lo que se ha probado el tratamiento con tamoxifeno. No obstante, amplios estudios aleatorizados no han podido demostrar un papel positivo de la terapia anti estrogénica en el manejo de melanoma metastásico (Lens y col., 2003).

Se han efectuado también numerosos ensayos clínicos utilizando IL-2 e INF α 2b, con rangos individuales de respuesta en alrededor del 15-20 % y raros casos de remisión durable, asociado a una significativa toxicidad (O'Day y col., 2002); por otro lado, la inyección de *Corynebacterium parvum* y BCG han servido poco como adyuvantes en inmunoterapia (Lipton y col., 1983).

Importantes instituciones como la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (Keilholz y col., 1997) y el Centro de Cáncer M. D. Anderson (Legha y col., 1996) han desarrollado grandes estudios de fase III, combinando diversos regímenes de quimioterapia con IL-2 e INF- α 2b, para tratar pacientes con melanoma en estadio IV; el primero no reportó mejoras significativas en la supervivencia de los pacientes, en tanto el segundo obtuvo un incremento en el número de respuestas durables y un aparente aumento en la supervivencia media de los pacientes, aunque la toxicidad del régimen fue severa.

Estudios de fase III más recientes concluyeron que los resultados de la bioquimioterapia no son mejores que los de la poliquimioterapia (Atkins y col., 2003; Del Vecchio y col., 2003).

Los resultados obtenidos hasta hoy en el tratamiento de melanomas en estadios avanzados no han sido muy alentadores, por lo que los esfuerzos más recientes en la búsqueda de terapias eficaces se han enfocado en estudios sobre terapia génica y en el desarrollo de vacunas.

Vacunas en cáncer

Las vacunas terapéuticas en cáncer, constituyen una novedosa estrategia inmunoterapéutica y tienen como objetivo estimular o potenciar en el huésped una respuesta inmunitaria contra los antígenos del tumor. Esta forma de terapia basada en la manipulación del sistema inmune puede complementar los tratamientos oncológicos convencionales; en la actualidad existen diversas preparaciones de vacunas que se encuentran en etapa de ensayos clínicos para diferentes neoplasias.

Las vacunas fueron inicialmente desarrolladas para la prevención de las enfermedades infecciosas, con gran éxito. Una parte de este resultado se debió a que los gérmenes (virus, bacterias, parásitos) son muy diferentes a los humanos, y por lo tanto es relativamente fácil "capacitar" al sistema inmunológico humano para que reaccione ante esos agentes extraños. La situación es mucho más compleja cuando se pretende que ese mismo sistema inmunológico humano pueda discriminar entre dos células humanas, una sana y otra, maligna (cáncer). En los últimos quince años ha venido creciendo la expectativa de hallar tratamientos eficaces contra el cáncer basados en la manipulación inmunológica (Restifo y Lewis, 2005).

A continuación se describen los diferentes tipos de vacunas utilizadas en cáncer, y algunos ejemplos de ensayos clínicos realizados hasta hoy.

Vacunas de células tumorales.

Se ha ensayado en varios tipos de tumores como melanoma, cáncer renal, entre otros; por lo general se utilizan adyuvantes para potenciar la respuesta. Las variantes vacunales utilizadas por este grupo han sido las células tumorales autólogas irradiadas, las células alogénicas intactas y los lisados celulares con o sin adyuvantes apropiados. Se prefieren las células autólogas por su compatibilidad con el sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) de los individuos a tratar. En la actualidad existen ensayos con vacunas autólogas + BCG o citocinas (IL-2, GM-CSF) en melanoma y cáncer de colon; pero resulta difícil la obtención de células en cantidades suficientes a partir de biopsias, así como lograr líneas celulares producto de estas extracciones. Por esta razón la vía más eficiente para maximizar la respuesta inmune de los pacientes contra las células tumorales autólogas es la formulación de

vacunas de células alogénicas que compartan antígenos HLA con el hospedero y que expresen en cantidades óptimas la mayoría de los antígenos tumor asociados, que incluyen proteínas y carbohidratos. Un grupo de investigadores del Instituto de Cáncer "John Wayne" de California en E.U. evalúa una vacuna alogénica conocida como CancerVax. Esta preparación incluye 3 líneas de melanoma que contienen los gangliósidos GM3, GM2, GD3 y GD2, con adyuvante BCG11 y estos ensayos se encuentran en fase III actualmente en pacientes en estadio III y IV de melanoma. Es importante tener en cuenta que estas vacunas alogénicas, aunque pueden inducir una amplia respuesta inmune protectora, presentan la desventaja potencial de inducir respuesta inmune contra antígenos que no están presentes en las células tumorales autólogas (Lewandrowski y Demierre, 2000).

Vacunas de antígenos purificados no proteicos.

(*Vacunas de carbohidratos, mucinas, o gangliósidos*). Las vacunas basadas en gangliósidos purificados de mayor importancia son las que han sido propuestas por *Livingston* y otros (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA). Estos investigadores han realizado ensayos clínicos fase I y han utilizado el gangliósido GM2 purificado como antígeno, administrándolo por la vía subcutánea, solo o combinado con diferentes adyuvantes, en pacientes con melanoma en estadio III ó IV. El gangliósido solo no resulta inmunogénico, unido covalentemente a KLH, sin adyuvante o asociado con BCG muestra una inmunogenicidad moderada y cuando se administra conjugado con KLH en compañía de la saponina QS-21, resulta un inmunógeno potente (vacuna GM2-KLH-QS21 en melanoma + INF alfa) (Livingston, 1997). Es importante señalar que una vacuna que combine más de un antígeno purificado debe resultar más eficiente en el tratamiento de los pacientes con cáncer, ya que permitiría aumentar el número de células tumorales que logran eliminarse, porque la expresión de antígenos es heterogénea (Schumacher, 2001).

Vacunas de proteínas/péptidos específicos.

Se encuentran diseñadas a partir de antígenos asociados a tumor o menos frecuentemente de antígenos específicos. Estas secuencias son reconocidas por

células T. El péptido o proteína puede administrarse purificado o sintetizado formando parte de la vacuna o puede inducirse la síntesis del péptido o antígeno tumoral dentro de la célula blanco (transfección). Las vacunas que utilizan como péptido antigénico la tirosinasa, la gp 100, y el MART 1 se encuentran en fase III en pacientes con melanoma. Otro ejemplo lo constituye el complejo péptido-glicoproteína de shock térmico gp96, esta glicoproteína sola no es inmunogénica, pero su asociación con péptidos específicos posibilita el desarrollo de una potente respuesta inmune de células T. Esta vacuna se encuentra en ensayo clínico fase III para el tratamiento de pacientes con cáncer renal estadio III (Caudill y Li, 2001).

Vacunas de vectores virales

Los más ensayados han sido adenovirus, aunque se han utilizado otros (retrovirus); y pueden codificarse también genes de citocinas. Las vacunas con vectores virales se ensayan fundamentalmente en melanoma, aunque en ningún caso se ha logrado incrementar supervivencia en modelos animales (Coulie, 1997; Geutskens, 2000).

Vacunas de células dendríticas o de apc profesionales.

Parecen ser muy efectivas para la generación de una respuesta de LT específica contra el tumor, al pulsar células dendríticas con el antígeno tumoral (cultivo *ex vivo*) y posteriormente administrarlas en el huésped; los antígenos se incorporan a las moléculas del MHC o son sintetizados en el citoplasma entrando en la ruta de presentación antigénica de MHC clase I, por tanto, el uso de células dendríticas en preparaciones vacunales constituye un arma importante en la inmunidad antitumoral. Estas vacunas pueden ser diseñadas para antígenos compartidos por tumores, por ejemplo: MAGE, tirosinasa y gp100 en melanoma, así como proteínas RAS mutante y p53 en otros tumores, donde se incluyen los localizados en la próstata (Timmerman y Levy, 1999; Brossart y *col.*, 2001; Fong y *col.*, 2001). Otro ejemplo es el Sipuleucel-T [APC 8015, Provenge], una vacuna

autóloga, basada en células dendríticas, bajo el desarrollo de la Corporación Dendreon, para el tratamiento de cáncer de próstata, la cual fue aprobada por la FDA en 2010. Esta vacuna tiene como blanco el antígeno específico de próstata conocido como fosfatasa ácida prostática (PAP), el cual se expresa en aproximadamente el 95% de los cánceres de próstata y ha demostrado incrementar la sobrevivencia de manera significativa (Drugs RD, 2006).

Vacunas de ADN.

Consisten en plásmidos que codifican antígenos tumorales, este tipo de inmunización está en uso en ensayos con diferentes neoplasias y tienen la ventaja de inducir preponderantemente una respuesta de células T restringida a MHC clase I. En la actualidad se desarrollan nuevas estrategias para este tipo de vacuna a través de la fusión de genes, un ejemplo de esto es el ensayo clínico fase I en pacientes con linfoma no Hodgkin con el empleo de una vacuna donde se fusionan genes que codifican para determinantes idiotípicos de la molécula de inmunoglobulina con una secuencia del antígeno del toxoide tetánico, lo que posibilita la activación de los mecanismos efectores del sistema inmune (Rosenberg, 1999; Zhu y *col.*, 2001).

En vacunas de ADN *in vivo* se han utilizado varias técnicas de inoculación, con el objeto de incrementar la respuesta inmune del hospedero. Las más empleadas se basan en el empleo de pistola de genes, electroporación e inyección directa por vía intramuscular, intravenosa e intradérmica (Peachman y *col.*, 2003).

El método de inmunización por pistola de genes garantiza la mayor eficiencia, puesto que el ADN penetra directamente al interior de las células, a diferencia de la inyección donde queda en el medio intersticial y por tanto expuesto a degradación por nucleasas. Debido a ello se ha observado que se requieren dosis hasta 100 veces menores de plásmido cuando se inmuniza con pistola de genes (Van Drunen y *col.*, 2000). Las rutas para la presentación de antígenos a linfocitos B y T y su activación para realizar su acción efectora se muestran en la figura 1.

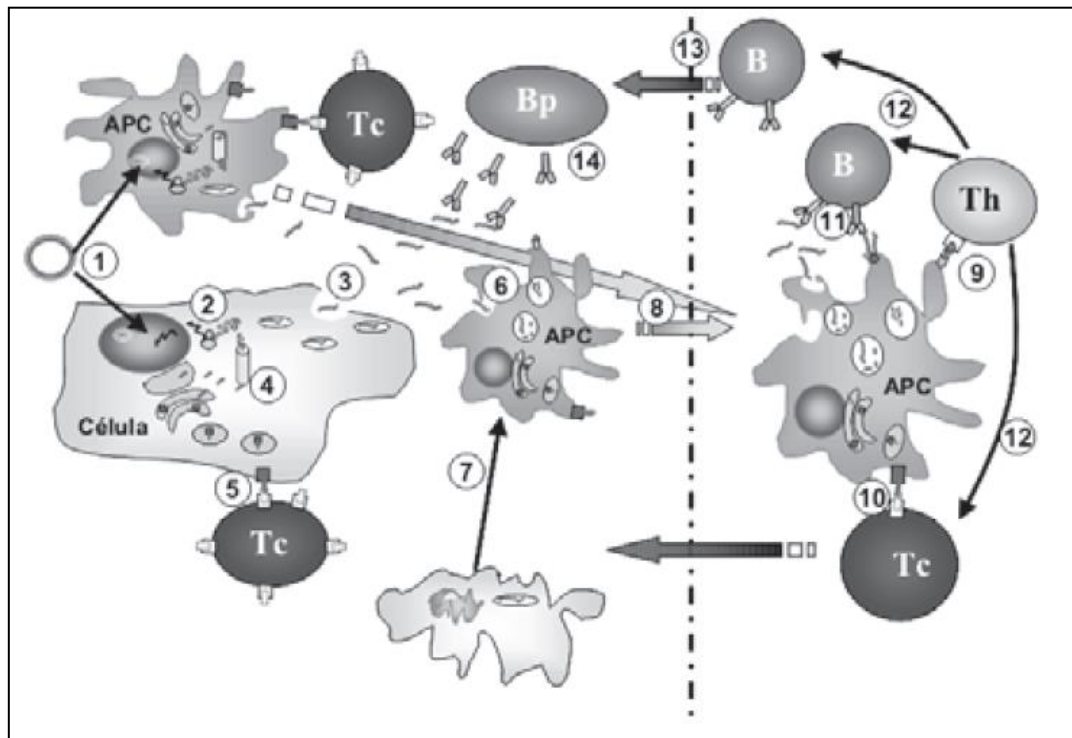


Fig. 1. Rutas de presentación de antígenos y activación de linfocitos B y T en la vacunación con ADN. (1) El plásmido se introduce al organismo y las células transfectadas (una célula somática o una célula presentadora de antígeno profesional [APC, por sus siglas en inglés]); éste se transloca al núcleo, donde se produce el mRNA. (2) El mRNA se traduce en los ribosomas y la proteína se (3) secreta o (4) procesa en el proteosoma. Los productos se transportan a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, donde se acoplan a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I) (5). (6) Las APC fagocitan a las proteínas solubles y las procesan en los endosomas, donde se acoplan a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II). Las proteínas codificadas en los plásmidos pueden también captarse por la fagocitosis de células transfectadas en estado apoptótico (7). (8) Las APC con los antígenos adquiridos por la transfección o fagocitosis migran hacia los órganos linfoides secundarios donde se presentan a los linfocitos T cooperadores (Th) en el contexto de MHC II (9) o por “presentación cruzada” en el contexto de MHC I a los linfocitos T citotóxicos (Tc) (10). Los linfocitos B se activan mediante su BcR por las proteínas presentadas en la superficie de las APC o por las proteínas liberadas al medio debido a apoptosis o lisis de las APC (11). Las líneas punteadas indican que las proteínas solubles o contenidas dentro de las células apoptóticas (no APC) podrían llegar al BcR de los linfocitos B por alguna otra vía no conocida. Los linfocitos Th activados estimulan a los Tc y B (12), lo cual favorece la sobreexpresión de moléculas de superficie (coestimuladoras), así como también el cambio de isotipo. Los linfocitos activados migran hacia la periferia (13) donde llevan a cabo su actividad efectora (14). (Tomado de Mota-Sánchez J. *Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria*. Salud Publica Mex 2009;51 supl 3:S463-S469.)

Un hecho que resulta crítico en el desarrollo de vacunas, incluyendo las de ADN es el uso de sustancias o moléculas que potencien la respuesta inmune en contra de los tumores (adyuvantes o drogas terapéuticas), considerando que la mayor parte de los antígenos tumorales no son muy inmunogénicos, hecho que es demostrado en algunas neoplasias por la presencia de anticuerpos contra antígenos tumorales e incluso de células T citotóxicas específicas, que son incapaces de erradicar el cáncer.

Gemcitabina

La Gemcitabina (GEM) (2, 2-difluorodesoxicitidina, dFdC) es una droga terapéutica análoga de los nucleósidos denominados pirimidinas (fig. 2), y como tal, compite con su contraparte fisiológica al ser incorporada indistintamente en el ADN provocando la inhibición de la replicación, con lo cual se ha ganado un lugar importante en el tratamiento contra el cáncer. Específicamente, la GEM es el análogo de citidina más importante que se incluye en ensayos clínicos contra el cáncer. Además, se ha incorporado dentro de la terapia estándar de primera línea para pacientes con cáncer de páncreas (Takahara y *col.*, 2011; Conroy y *col.*, 2012; Padhye y *col.*, 2011; Abbruzzese, 2002; Okusaka, y *col.*, 2012), y también ha sido aprobada contra cáncer de pulmón, cáncer de células transicionales de la vejiga (Chabner y *col.*, 2005) así como contra cáncer de cabeza, de cuello, de colon, de ovario, de pulmón no micricítico, y de mama (Arias y *col.*, 2011; Reddy y *col.*, 2011). Esta droga se seleccionó para el desarrollo de terapias con base en su sobresaliente actividad contra tumores sólidos murinos y aloinjertos humanos en ratones desnudos.

Farmacología celular, metabolismo y mecanismo de acción.

La GEM es administrada por vía intravenosa. Es una droga polar con baja permeabilidad en la membrana celular (Song y *col.*, 2005). El influjo de la GEM a través de la membrana ocurre vía transportadores activos de nucleósidos, y la desoxicitidina quinasa fosforila intracelularmente a la GEM para producir

difluorodesoxicitidina monofosfato (dFdCMP), a partir de la cual es transformada en difluorodesoxicitidina difosfato y trifosfato (dFdCDP, dFdCTP).

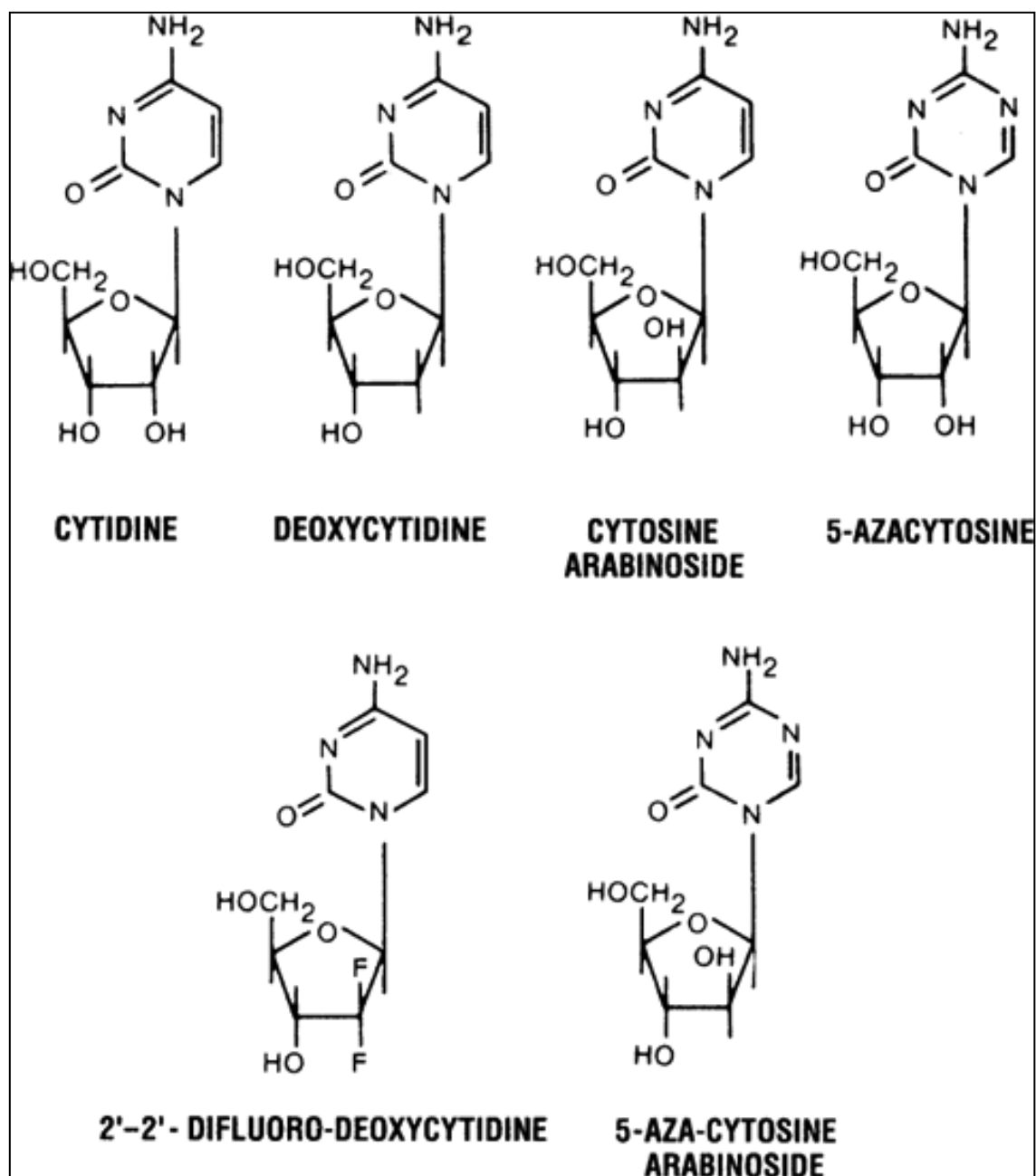


Figura 2. Estructura de moléculas análogas de citidina entre las cuales se incluye a la GEM (2,2-difluoro desoxicitidina).

La afinidad de la GEM por la desoxicitidina quinasa es tres veces más baja que la de la desoxicitidina, sin embargo tiene 50% menos afinidad por la citidina desaminasa comparada con la desoxicitidina. La conversión de la GEM por la citidina desaminasa en difluorodesoxiuridina (dFdU) representa la principal ruta

catabólica. En un menor grado, la pirimidina nucleósido fosforilasa elimina la GEM al separar la base pirimidina del anillo de furanosa.

Al igual que con otros análogos de citidina, estudios *in vitro* con GEM sugieren una potente inhibición de la síntesis de ADN como su mecanismo de acción, pero los estudios cinéticos indican que los efectos de la GEM no están confinados a la fase S del ciclo celular, y que esta droga es efectiva tanto contra células confluentes como contra células en la fase logarítmica de crecimiento. La actividad citotóxica puede ser el resultado de varias acciones sobre la síntesis de ADN: la dFdCTP compite con dCTP como un inhibidor débil de la DNA polimerasa; dFdCDP es un potente inhibidor de la ribonucleótido reductasa, lo cual resulta en una baja de las pozas de desoxirribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN; y la dFdCTP es un sustrato para la incorporación al ADN, que luego de la incorporación de un nucleótido más, causa la terminación de la síntesis de la cadena de ADN. Este nucleótido “extra” puede ser de importancia para esconder la dFdCTP de las enzimas reparadoras de ADN ya que la incorporación de GEM en el ADN parece ser resistente a los mecanismos normales de reparación. Estos efectos sobre la síntesis de ADN representan el principal mecanismo de acción de la GEM (fig. 3) y existe evidencia que demuestra que para que se induzca la apoptosis por GEM el evento crítico es la incorporación de dFdCTP al ADN.

En células leucémicas la dFdCTP tiene una cinética de eliminación bifásica con una vida media α ($t_{1/2} \alpha$) de 3.9 horas y una vida media β ($t_{1/2} \beta$) de 16 horas. También, con la exposición a la droga se bloquea la incorporación de citidina marcada en las pozas celulares de dCTP. Además, la dFdC causa una disminución en todos los desoxinucleótidos trifosfato, lo cual es consistente con la inhibición de la ribonucleótido reductasa. La significancia de la inhibición de la ribonucleótido reductasa es incierta, ya que se ha demostrado resistencia a la GEM por medio de la sobreexpresión de la ribonucleótido reductasa. No obstante, la significancia de la inhibición de la ribonucleótido reductasa podría recaer en los efectos potenciadores de la depleción de desoxirribonucleótidos en otros sitios de acción de la GEM. Por ejemplo, la desaminación de dFdCMP por la dCMP desaminasa requiere la activación por dCTP.

A medida que la poza de dCTP se va eliminando por efecto de la GEM en la ribonucleótido reductasa, ocurre menos desaminación de la dFdCDP y aumenta la

acumulación intracelular de metabolitos de GEM. Aunado a esto, la alta concentración intracelular de dFdCTP inhibe directamente a la dCMP desaminasa.

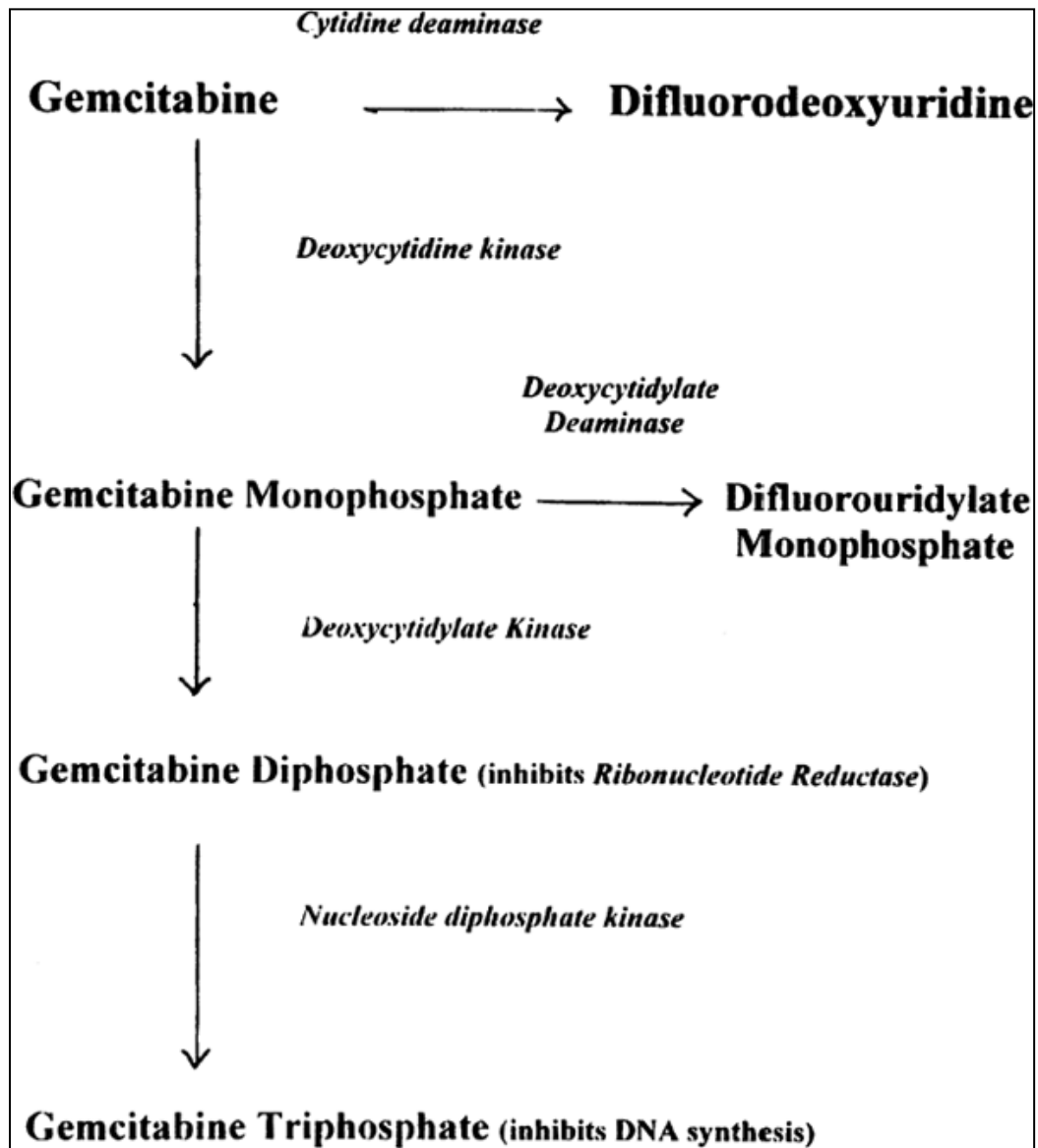


Figura 3. Pasos clave en el metabolismo de la GEM y función asociada al metabolito producido.

La actividad de la dFdCTP en el mecanismo de reparación del ADN puede producir una citotoxicidad aumentada de otros agentes quimioterapéuticos, particularmente compuestos con platino. El cisplatino actúa formando entrecruzamientos inter e intracatenarios en el ADN. Un mecanismo de resistencia puede ser la remoción de dichos entrecruzamientos por medio de la reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés: *nucleotide excision repair*). Estudios preclínicos con líneas celulares tumorales muestran que las uniones de

ADN con cisplatino incrementan en la presencia de GEM. En líneas de células tumorales resistentes a cisplatino, las cuales tienen expresión aumentada de NER, la adición de GEM inhibió la reparación de lesiones en el ADN inducidas por cisplatino y se correlacionó con un sinergismo citotóxico.

Mecanismos de resistencia.

La resistencia a la GEM aún no se comprende totalmente. Estudios *in vitro* sugieren varios mecanismos posibles, entre los cuales se pueden mencionar: niveles tumorales bajos de desoxicitidina quinasa; inducción de la citidina desaminasa; altas concentraciones de proteínas de shock térmico; expresión elevada de ribonucleótido reductasa; y por último, la inhibición de transportadores de nucleósidos, con lo cual se previene el influjo de GEM a través de la membrana celular. La ausencia de dichos transportadores se ha asociado con supervivencia reducida en pacientes con cáncer de páncreas.

Datos farmacocinéticos.

En animales, la farmacocinética de la GEM está determinada principalmente por la desaminación, la cual procede más rápidamente en ratones que en perros. La vida media de la GEM en ratones es de 0.28 horas comparada con 1.38 horas en perros. En ambas especies, el producto de eliminación predominante es el difluoro desoxiuridina (dFdU). Se ha determinado que tanto en líneas celulares *in vitro* como en células extraídas de pacientes durante tratamiento, la acumulación máxima de dFdCTP se obtiene cuando la concentración de la droga en el plasma (o medio de cultivo) están en el rango de 15 a 20 $\mu\text{mol/L}$, un nivel que se alcanza durante infusiones de 300 mg/m^2 por 3 horas.

En un estudio en fase 1 de pacientes con leucemia tratados con GEM se determinó que la dosis máxima tolerada (MTD, maximum tolerated dose) fue de 1000 mg/m^2 en 30 minutos por semana durante tres semanas seguidas por una semana de descanso. La toxicidad limitante de la dosis fue la mielosupresión caracterizada por trombocitopenia, casi sin afectar a los granulocitos. No se encontró relación entre el grado de mielosupresión y los parámetros de la farmacocinética. La

eliminación de la droga fue independiente de la dosis pero varió ampliamente entre individuos (Abbruzzese, y *col*, 1991). Aunque una dosis más alta de GEM (2,200 mg/m² en 30 minutos) puede ser administrada sin riesgo bajo el esquema antes mencionado a pacientes con tratamientos menos agresivos o que no hayan recibido quimioterapia, no se ha demostrado con ello ningún mejoramiento en la eficacia. La falta de correspondencia de la respuesta con el aumento de la dosis puede deberse a la limitada habilidad de las células para generar el metabolito activo. La activación de la GEM por la desoxicitidina quinasa que la transforma en dFdCTP se satura con rangos de infusión de aproximadamente 10 mg/m² por minuto. El método de infusión de la dosis a una proporción constante de 10 mg/m² produjo un estado estacionario de los niveles de dFdC de 15 a 20 µmol/L en plasma, resultando en niveles más altos de dFdCTP en células leucémicas circulantes que aquellos obtenidos en una infusión fija de 30 minutos.

La GEM ha sido estudiada en niños y la MTD de GEM administrada como una infusión en 30 minutos a la semana por 3 o 4 semanas es 1,200 mg/m². La mielosupresión es la toxicidad limitante de la dosis, y la farmacocinética de los pacientes pediátricos es similar a la de la población adulta.

Toxicidad.

Aunque es clínicamente efectiva, la GEM exhibe varios efectos secundarios tales como mielosupresión, hepatotoxicidad, y toxicidad renal, lo cual se atribuye a su incapacidad de distinguir entre las células normales y las células blanco (Song, y *col.*, 2005). La toxicidad limitante de la dosis de GEM es invariablemente hematológica, caracterizada por mielosupresión en la que destacan la neutropenia y en menor escala la trombocitopenia. El perfil toxicológico difiere de acuerdo al esquema de administración. En general, las infusiones de larga duración conducen hacia una mayor mielosupresión. En cuanto a la toxicidad no hematológica, aproximadamente en el 45% de los pacientes se manifiestan síntomas parecidos a los de la gripe incluyendo fiebre, dolor de cabeza, dolor de espalda y mialgias. La duración de estos síntomas es corta. La astenia también es común, con una ocurrencia del 42% entre los pacientes.

Sensibilización a la radiación.

Gracias a la inhibición que produce en la ribonucleótido reductasa y en la DNA polimerasa, la GEM puede tener un fuerte efecto de sensibilización a la radiación. Estudios preclínicos con GEM han mostrado efecto sensibilizador a la radiación en líneas celulares humanas de cáncer de colon, páncreas, cabeza, cuello, y cérvix. Estos efectos son paralelos a la depleción intracelular de desoxiadenosina trifosfato y son más prominentes cuando la GEM se administra antes de la radioterapia. Sobresale el hecho de que el efecto de radiosensibilización no tuvo correlación con la incorporación de dFdCMP en el ADN, lo cual sugiere que la inhibición de la ribonucleótido reductasa es el principal mecanismo de acción. A pesar de la radiosensibilización observada en estudios preclínicos, los estudios iniciales en fase I y fase II con GEM y radioterapia no han demostrado mejoría significativa en actividad clínica, pero sí se observa un aumento en la toxicidad.

La GEM ha sido una droga clave en la quimioterapia contra el cáncer de páncreas avanzado resultando en beneficios clínicos y una mayor sobrevida. De modo que la combinación de la GEM con otros agentes podría generar un campo prometedor para mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer de páncreas avanzado. Como ejemplo de esto se tienen estudios en los que se combina la GEM con cisplatino como tratamiento para el cáncer de tracto biliar cuyos resultados muestran aumento en la sobrevivencia comparados con la monoterapia de GEM. Sin embargo, los efectos finales de la quimioterapia por sí sola en cáncer de páncreas y de tracto biliar siguen siendo limitados, encontrándose raramente sobrevivencia a largo plazo. Por lo tanto, la combinación de la GEM con otros métodos como la inmunoterapia resulta atractiva (Kaida, y *col.*, 2011; Mellman y *col.*, 2011), ya que se ha demostrado que el tratamiento con GEM induce la proliferación de monocitos CD14⁺ y de células dendríticas CD11c⁺, es decir, la GEM no suprime las células inmunológicas y a la vez incrementa el número de células dendríticas, las cuales sirven como células presentadoras de antígeno, lo cual apoya la posibilidad de la terapia combinada de GEM con inmunoterapia específica (Soeda y *col.*, 2009). Una forma de inmunoterapia son las vacunas de ADN o de péptidos dirigidas contra antígenos tumorales. De entre los antígenos tumorales sobresale la proteína del tumor

de Wilms (WT1), la cual ha sido posicionada como el antígeno número uno en el proyecto de prioridad de antígenos tumorales auspiciado por el Instituto Nacional del Cáncer. En pacientes leucémicos portadores de tumor se ha descubierto la inducción espontánea tanto de linfocitos T citotóxicos con especificidad para WT1 como de anticuerpos contra WT1. Estos resultados indican que la proteína WT1 es altamente inmunogénica, con lo cual dicha proteína se establece como un blanco prometedor para ser reconocido por linfocitos T citotóxicos específicos (Babiarova y *col.*, 2012). En un ensayo clínico reciente en fase I en el cual se probó la combinación de una vacuna de péptido WT1 y GEM para el tratamiento de cáncer avanzado de páncreas varios pacientes mostraron una marcada regresión del tumor. De otro trabajo es relevante destacar que se demostró que el tratamiento con GEM regula positivamente la expresión de *WT1* en líneas celulares de cáncer de páncreas (Takahara y *col.*, 2011). Estos resultados sugieren que la respuesta inmunológica antitumoral dirigida contra WT1 y el tratamiento con GEM pueden funcionar de manera sinérgica contra células tumorales. Es por eso que en el presente trabajo se ha escogido como terapia una vacuna de ADN basada en WT1.

Gen del tumor de wilms (*WT1*)

Mutaciones en el gen *WT1*, localizado en el brazo corto del cromosoma 11p13, fueron inicialmente descubiertas en el tumor de Wilms (TW), un cáncer renal pediátrico que afecta células precursoras embrionarias pluripotentes y tiene una frecuencia cercana a 1 en 10,000 niños en Estados Unidos (Little y Wells, 1997).

Se sabe que sólo el 15% de los casos de TW esporádicos presentan alteraciones en *WT1*, denotando una función supresora de tumor, sin embargo en la mayoría de los casos de TW se expresa la forma wild-type de dicho gen y con baja frecuencia, mutaciones heterocigotas provocan síndromes asociados al TW, siendo éstos: WAGR (WT, aniridia, anormalidades genitourinarias y retraso mental), Denys-Drash y Frasier (Little y Wells, 1997; Rauscher, 1993).

El gen *WT1* codifica un factor de transcripción involucrado en proliferación, diferenciación celular y apoptosis (Menke y col., 1998).

Muchos genes son blanco de activación/represión transcripcional por parte de WT1, destacando varios importantes en crecimiento y metabolismo celular, como son componentes de matriz extracelular (CME), factores de crecimiento y factores de transcripción (incluido el mismo *WT1*). La regulación puede ser tanto positiva como negativa (Tabla 3) (Yang y col., 2007).

Tabla 3. Genes que son blancos transcripcionales de WT1.			
Blanco	Efecto	Blanco	Efecto
F. de crecimiento			
<i>Anfíregulina</i>	Activación	<i>Factor de crecimiento der. de plaquetas</i>	Represión/activación
<i>Factor estimulante de colonias-1</i>	Represión	<i>Factor de crecimiento transformante</i>	Represión
<i>Factor de crecimiento de la insulina II</i>	Activación/represión		
Enzimas			
<i>Transcriptasa reversa de telomerasa humana</i>	Represión	<i>Descarboxilasa de ornitina</i>	Represión
Receptores			
<i>R. de andrógeno</i>	Represión	<i>R. del factor de crecimiento de insul. I</i>	Represión
<i>R. del factor de crecimiento epidermal</i>	Represión	<i>R. alfa del ácido retinóico</i>	Represión
<i>R. de insulina</i>	Represión		
F. de transcripción			
<i>c-Myb</i>	Represión	<i>Ciclina G1, IGFBP-4</i>	Activación
<i>c-Myc</i>	Activación/represión	<i>P-21</i>	Activación
<i>Ciclina E</i>	Represión	<i>Pax-2</i>	Represión
CME			
<i>E-caderina Humana</i>	Incremento	<i>Sindecano 1</i>	Activación
<i>Trombospondina 1</i>	Represión		
Otros			
<i>Wnt-4</i>	Activación	<i>Eritropoyetina</i>	Activación
<i>Bcl-2</i>	Activación/represión		

En el desarrollo embrionario, *WT1* se expresa primordialmente en sistema urogenital; en tejidos adultos se expresa en sistema urogenital, sistema nervioso

central y tejidos hematopoyéticos, incluyendo médula ósea y nodos linfáticos (Haber y col., 1991).

Estructura de *WT1*.

El gen *WT1* está conformado por cerca de 50 kb, contiene 10 exones y produce un RNAm de 3.5 kb, el cual puede sufrir dos ‘splicing’ alternativos durante su maduración en los exones 5 y 9. En el primero se insertan o no 17 aminoácidos y en el segundo se incorporan o eliminan los aminoácidos lisina, treonina y serina (KTS), dando como resultado cuatro isoformas designadas como (-,-), (+,-), (-,+) y (+,+), representando la presencia o ausencia de los insertos 17aa y KTS, respectivamente (Haber y col., 1991). Lo anterior se puede observar esquematizado en la figura 4.

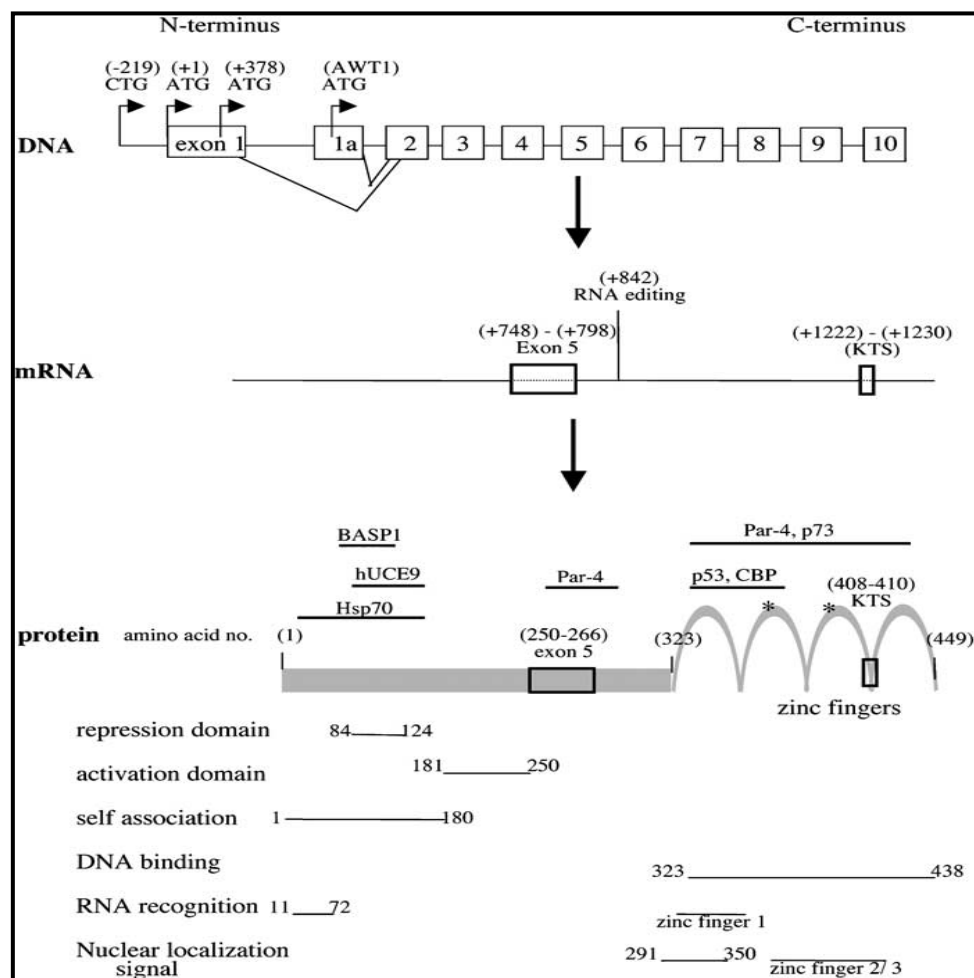


Figura 4. Estructura del gen *WT1*.

El RNAm tiene tres sitios de inicio de la traducción, lo que resulta en tres isoformas con distinto peso molecular: 36-38, 52-54 y 62-64 kilodaltones (Scharnhorst y *col.*, 1999). La isoforma mediana representa la forma típica de WT1 y posee un extremo carboxilo terminal con cuatro dedos de zinc tipo Krüpel (codificados en los exones 7-10), que son los sitios de unión a secuencias de DNA ricas en G-C y algunas proteínas, así como un extremo amino terminal que presenta un sitio de transactivación rico en prolina y glutamina, un dominio de dimerización y otro de represión (Lee y Heaver, 2001). Motivos adicionales en la proteína WT1 son esenciales para auto-asociación, localización nuclear y reconocimiento de RNA (Scholz y Kirschner, 2005).

La combinación de 'splicing' alternativos, edición de RNA y sitios de inicio de traducción, hacen que se generen al menos 24 diferentes variantes de WT1 en mamíferos (Wagner y *col.*, 2003).

WT1 en cáncer.

El gen *WT1* es ampliamente aceptado como supresor de tumor en aproximadamente 15% de los tumores de Wilm's. No obstante en los últimos años se han reportado datos de la expresión de *WT1* wild-type en tumores adultos de diferente origen, por lo que se ha propuesto su rol como oncogén en esas neoplasias.

Por ejemplo, ha sido descrita la sobreexpresión de *WT1* en neoplasias hematológicas, incluyendo leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda y crónica, así como en síndromes mielodisplásicos, asociándose a un pobre pronóstico (Rosenfeld y *col.*, 2003).

En un estudio, se determinó la expresión de *WT1* por RT-PCR en 34 líneas celulares de tumores sólidos, incluyendo provenientes de cáncer gástrico, de colon, pulmón, mama, de células germinales, ovario, útero, tiroides y carcinoma hepatocelular, de las cuales 28 (82%) expresaban *WT1* (Oji y *col.*, 1999).

Nakatsuka y *col* (2006) examinaron 494 casos de cánceres humanos por inmunohistoquímica (IHQ) y hallaron positividad a WT1 en tumores de estómago,

próstata, cérvix, endometrio, ovario, cerebro, esófago, páncreas, próstata, mama, riñón, pulmón, piel, entre otros.

La expresión de *WT1* y la multiquimiorresistencia han sido asociadas en algunas neoplasias hematológicas, sugiriendo que WT1 puede ser considerado como un marcador de quimiorresistencia (Hirose, 1999); recientemente se demostró que WT1 puede actuar como mediador de resistencia a terapia antiestrogénica en cáncer de mama, a través del bloqueo de la expresión del receptor de estrógenos-alfa (Han, y *col.*, 2008).

La relevancia de WT1 en proliferación y supervivencia de líneas leucémicas fue evidenciada al usar RNAi dirigidos contra WT1 y Bcl-2. La reducción de la expresión de *WT1* provocó una baja en proliferación celular con inducción de apoptosis en células K562 y HL-60, pero interesantemente la combinación simultánea de ambos RNAi no logró el efecto del RNAi-WT1 solo, ni sobre el crecimiento celular ni en nivel de muerte celular programada (Glienke y *col.*, 2007).

WT1 en melanoma.

Dentro de la diversidad de tumores sólidos que expresan altos niveles de WT1, melanoma no es la excepción.

En 1994, mediante PCR se detectaron transcritos de *WT1* en 7 de 9 líneas celulares de melanoma, mas no así en 5 líneas de melanocitos normales (Rodeck y *col.*, 1994).

Perry y *col.* (2006) demostraron por IHQ que WT1 es más común en melanomas primarios (51-83.7%), comparado con nevos (7.4-29.6%), proponiendo la utilidad de la técnica empleada como una herramienta a considerar en la distinción de lesiones malignas y no malignas.

Otros investigadores analizaron 7 tumores de melanoma también por IHQ, para lo cual utilizaron un anticuerpo policlonal y otro monoclonal, ambos para WT1.

Con el primer anticuerpo obtuvieron una inmunopositividad del 57%, en tanto el uso del segundo les permitió aumentar la positividad diagnóstica a un 86% (Nakatsuka y *col.*, 2006).

Recientemente Wagner y *col.* hallaron que más del 80% de las líneas de melanoma maligno usadas en su estudio expresaron *WT1*, pero no encontraron indicios de expresión en piel normal ni en nevos melanocíticos benignos (Wagner y *col.*, 2008). Por lo anterior, dentro de los múltiples estudios preclínicos y clínicos que involucran vacunación contra antígenos tumorales, deber considerarse a *WT1* como un promisorio blanco terapéutico en el tratamiento del melanoma maligno.

HIPÓTESIS

El tratamiento simultáneo con una vacuna de ADN contra WT1 y GEM produce un efecto sinérgico que amplifica la respuesta antitumoral en melanoma.

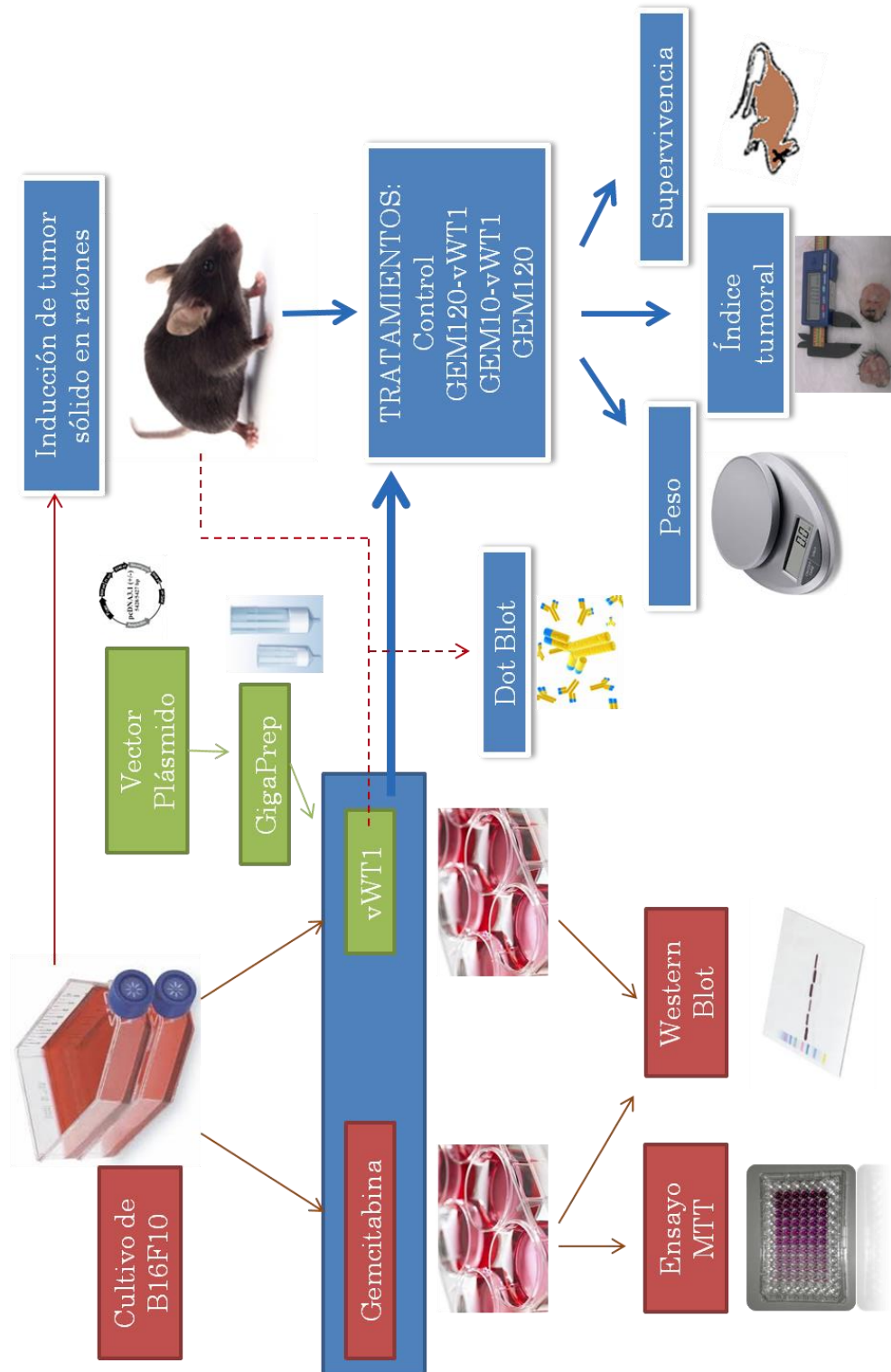
OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antitumoral de la combinación de la vacuna contra WT1 y GEM en un modelo murino de melanoma.

Objetivos particulares

- Determinar la dosis letal media (DL50) de GEM en células B16F10 de melanoma murino.
- Analizar la expresión de *WT1* en células B16F10 tratadas con GEM y control.
- Caracterizar el plásmido con la secuencia de *WT1*.
- Evaluar la presencia de anticuerpos contra WT1 en ratones tratados con la vacuna.
- Determinar el peso y el índice tumoral en ratones tratados con la combinación de la vacuna contra WT1 y GEM, GEM sola y en ratones control.
- Analizar la sobrevivencia de ratones tratados con la combinación de la vacuna contra WT1 y GEM, GEM sola y en ratones control.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y METODOLOGIA

Línea celular y animales

Se utilizó la línea celular de melanoma murino B16F10, la cual se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Las células fueron cultivadas y mantenidas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-F12) (Life Technologies, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, NY, USA) e incubadas a 37 °C en una atmósfera a 95% de O₂ y 5% de CO₂.

Se emplearon ratones hembra de la cepa C57BL6, de 7 a 8 semanas de edad (Harlan México, S.A. de C.V.). Los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, bajo condiciones libres de patógenos.

Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo protocolos estandarizados, de acuerdo a las recomendaciones generales para el manejo y cuidado de animales de laboratorio (Fuentes-Paredes y *col.*, 2008; B. D. Morton y *col.*, 2001).

Determinación de viabilidad y proliferación en células B16F10 tratadas con GEM (DL₅₀ de GEM)

Se plaquearon 3,000 células por pozo en 200 µl de medio y se incubaron por 24 h en condiciones estándar hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Luego, para los ensayos destinados a determinar la DL₅₀ se reemplazó el medio normal por 200 µl de medio por pozo con diferentes concentraciones (0, 1, 5, 10, 30, 50, 100, 500 y 1000 ng/mL) de Gemcitabina (GEM) (Accogem, de Accord Farma), mientras que para los ensayos destinados a evaluación de proliferación, el medio normal se reemplazó con otro set de concentraciones de GEM (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 50, 100, 200 y 300 ng/ml) en 200 µl de medio. Las placas se incubaron por 48 h para viabilidad, y por 24 y 48 h para proliferación. Una vez concluida la incubación respectiva de cada placa, se agregaron 22 µL del reactivo MTT a cada pozo, se incubó por 1 h a 37 °C y después se desechó el contenido del pozo decantándolo suavemente para evitar el desprendimiento de las células, en seguida se añadieron 100 µl de DMSO para disolver el formazán, se dejó incubar 15 min y se midió la absorbancia con un lector de ELISA. Con los datos de la absorbancia se realizaron las gráficas correspondientes.

Extracción y cuantificación de proteínas

Se plaquearon 200,000 células por pozo en placas de 6 pozos y se incubaron por 24h en condiciones normales de cultivo, después el medio normal fue reemplazado por medio con varias concentraciones (0, 2.5, 10, 50 y 300 ng/mL) de GEM y las células fueron cosechadas a las 24 y 48 h, mediante desprendimiento con tripsina 0.25%, posterior recolección en tubos eppendorf y centrifugación por 3 min a 5000 rpm para desechar el sobrenadante y obtener el pellet celular. Estos pellets fueron lavados tres veces con PBS estéril.

El paquete celular se resuspendió en buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 150 mM, Tris 25 mM pH 7.6) y se incubó en hielo por 30 min. Transcurrido ese tiempo se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm y el sobrenadante conteniendo las proteínas se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a -80 °C hasta su cuantificación.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el kit DC Protein Assay de Bio-Rad, en el cual se incluyen estándares para poder graficar una curva patrón y determinar con base en esta la concentración de proteínas de las muestras. En resumen, en una placa de 96 pozos, para cada reacción se añade al pozo 19µl del reactivo A, 1µl del reactivo S, 3µl de muestra o estándar, y 177µl del reactivo B, se deja incubando la placa por 10 min en oscuridad a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 570nm.

Western blot

a) Preparación de las muestras

50 microgramos de proteínas totales se desnaturalizaron en buffer de carga 6X (β -mercaptoetanol, SDS, Glicerol, Azul de bromofenol), para lo cual se hirvieron durante 5 min.

b) Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, se colocó en la cámara de electroforesis con buffer de corrida (Tris Base 25 mM, Glicina 250 mM pH 8.3, SDS 1%) y se cargaron las muestras en los carriles, así como un marcador de peso molecular.

Inicialmente se corrió por 20 min a 46 V y posteriormente se aumentó a 100 V, por espacio de 1 h con 40 min.

c) Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Para este paso, se preparó el mismo día el buffer de transferencia (100 ml solución stock Tris Base + Glicina, 200 ml de metanol y 700 ml de H₂O).

Una vez concluida la electroforesis, se sacó el gel con mucho cuidado y se formó un “sandwich”, para lo cual se colocaron de cátodo a ánodo: esponja, 2 papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, 2 papel filtro y esponja.

Se corrió en la cámara húmeda con buffer de transferencia por 2 h a 26 V.

d) Inmunodetección

Previamente se preparó una solución stock de TBS 10X pH 7.6 (Para un litro: 31.5 g Tris-HCl + 80 g NaCl y se ajustó al pH indicado).

Terminada la transferencia se colocó cuidadosamente la membrana de nitrocelulosa en una solución TBS-tween 1% + leche 5% por 1 h (bloqueo).

Luego se retiró la solución anterior y se quitó el exceso de leche mediante tres lavados con TBS Tween 1% tras lo cual se colocó el primer anticuerpo Anti-WT1 policlonal de conejo (C-19, Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:1000 en TBS-tween + leche 2.5%. Se dejó incubando toda la noche a 4 °C.

Concluida la incubación del anticuerpo primario, éste se retiró y se lavó la membrana con TBS-Tween 1% por 10 min en 3 ocasiones y enseguida se añadió el anticuerpo secundario (conjugado) anti-conejo + HRP diluido a 1:5000 también en TBS-Tween + leche al 2.5% y se incubó por 2 h a temperatura ambiente.

Se retiró el anticuerpo secundario y de nuevo se lavó la membrana, igual como se indicó en el párrafo anterior.

Enseguida se agregó a la membrana el sustrato de quimioluminiscencia (luminol A y B) en partes iguales por 5 min, se eliminó el exceso de luminol y se fijó en un cassette para ser expuesto a un film y revelado en el cuarto oscuro.

Finalmente, para la normalización de las muestras se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón Anti- β -actina (diluido 1:20000 en TBS-Tween + leche 2.5%) y se incubó por 2 h a temperatura ambiente; el anticuerpo secundario fue anti-ratón diluido a 1:5000 en TBS-Tween + leche al 2.5% y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. La inmunodetección para β -actina se realizó de igual manera con quimioluminiscencia, como se describió anteriormente. La densidad de las bandas obtenidas en el film, fue analizada con ayuda del programa Image Studio Lite, versión 5.2.

Transformación y Producción a gran escala del plásmido WT1 H+/-

Se utilizaron cepas vírgenes de la Bacteria *Escherichia coli* DH5- α calcio competentes para su transformación con los plásmidos proporcionados por la Dra. Ana Tari, que codifican para la isoforma grande (H+/-) y pequeña (S+/-) de WT1, de los cuales éste último fue utilizado como vacuna.

Primeramente se activaron las cepas de *E. coli* DH5-alfa, sembrando 50 μ L de la cepa en 5mL de caldo Luria durante 4 horas a 37° C. Se centrifugaron 10 minutos a 5000 rpm en una centrífuga “SPECTRAFUGE” dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 400 μ L de CaCl_2 0.1 M en frío para incubar por 20 minutos en hielo. Una vez pasado el tiempo se centrifugó a 5000 rpm, decantando el sobrenadante y se añadió 1 μ L del plásmido añadiendo 20 μ L de CaCl_2 0.1M; se incubó en hielo por 1 hora 40 minutos. Después se realizó un shock térmico a 40° C por un minuto e inmediatamente se incubó en hielo por 2 minutos. Se agregó 200 μ L de Caldo Luria, incubando 1 hora en “shaker” a 200 rpm y 37°C. Se tomaron 50 μ L del cultivo y se incubaron en 5 mL de Caldo luria por 24 horas a 37°C con 50 μ g/ mL de Ampicilina.

Después el crecimiento se pasó a otro matraz con 500 mL de Caldo Luria, añadiendo 50 μ g/ mL de Ampicilina y se incubó por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se obtuvieron los “pellets” celulares centrifugando en tubos de 50 mL concentrando los 500 mL a 3,000 rpm por 10 minutos.

Purificación del plásmido

Se utilizó un kit de purificación a gran escala (Pure Link Hi Pure Plasmid Midi Prep Kit de Invitrogen) para la extracción del plásmido, siguiendo el protocolo sugerido. Después de la realización completa del protocolo se procedió a la cuantificación en nanodrop 2000 (ThermoScientific) y se guardó a -20°C hasta su uso.

Transfección del plásmido en la línea celular B16F10

Para la transfección de la línea celular se utilizó una solución madre de Polietilenimina (PEI), un polímero catiónico, a una concentración de 150 mM. Para ello fueron sembradas 200,000 células/pozo en placas de 6 pozos, 24 h después se diluyeron por separado 4 µg del plásmido y 0.4 µl de PEI, cada uno en 100 µl de NaCl 150 mM por pozo. Luego la PEI fue añadida al plásmido y se incubó por 30 min. a temperatura ambiente. Finalmente se colocaron 200 µl de la mezcla por pozo y se incubó la placa por 48 h, tiempo en el cual se realizó la extracción de proteínas a partir de los paquetes celulares, para analizar la expresión de *WT1* mediante western blot y evaluar así la funcionalidad del vector utilizado como vacuna.

Establecimiento de tumor subcutáneo con células B16F10

Para el establecimiento del modelo murino de melanoma se utilizaron 5×10^5 células de los pases 3-12 resuspendidas en 150 µl de medio sin suero y se inocularon en ratones C57BL6 por vía subcutánea. La inoculación se realizó en el flanco derecho de la pata posterior del ratón. El conteo de células para la preparación de los inóculos se hizo por el método de exclusión de azul tripán.

Dot Blot para la medición de anticuerpos específicos para WT1 en suero

Para determinar la producción de anticuerpos específicos contra WT1 (IgG), se utilizaron sueros de ratones BALB/C tratados con una aplicación de 10 µg de plásmido por aerosol. El suero fue obtenido a los 21 días después de la administración del plásmido.

Primeramente se emplearon 100µL de buffer TBS por muestra, para humedecer la membrana de nitrocelulosa. Del extracto proteico se tomó una cantidad de 50µg de proteína y se completó a 200µL de buffer TBS. Se incubó por una hora. Posteriormente con ayuda de una bomba de vacío se absorbió el buffer y se

añadieron 200 μL de solución de bloqueo (TBS, 2% BSA y H_2O_2), dejando incubar una hora. Enseguida se hicieron dos lavados con buffer TBS y tween al 0.05% y se agregaron 100 μL de anticuerpo primario 1:500 (monoclonal de ratón contra WT1, Sigma Aldrich) dejando incubar por 45 minutos como control positivo. Para evaluar los títulos de anticuerpo, se diluyeron 10 μL del suero en 500 μL de TBS 1%. Luego se realizaron tres lavados con buffer TBS-tween al 0.05%. Después se añadió el anticuerpo secundario (anti ratón, Sigma Aldrich) 1:5000 y se incubó la membrana por 45 minutos. Finalmente se realizaron tres lavados con buffer TBS-tween al 0.05% y se añadió diaminobencidina y H_2O_2 para observar la reacción.

Esquema de tratamientos para evaluación de respuesta antitumoral

Los ratones se dividieron en cuatro grupos, incluyendo 5 ratones cada uno, los cuales se designaron y trataron de la siguiente forma: 1) **Grupo Control**: sin tratamiento; 2) **GEM120vWT1WT1**: grupo con la aplicación de GEM 120 mg/kg intraperitoneal cada tercer día por 5 aplicaciones más administración subcutánea de 1 μg de plásmido cada 7 días por 3 aplicaciones; 3) **GEM10vWT1**: grupo con la aplicación de GEM 10 mg/kg intraperitoneal cada tercer día por 5 aplicaciones más administración subcutánea de 1 μg de plásmido cada 7 días por 3 aplicaciones; y 4) **GEM120**: grupo con la aplicación de GEM 120 mg/kg intraperitoneal cada tercer día por 5 aplicaciones;. Se siguió el esquema de la figura 5.

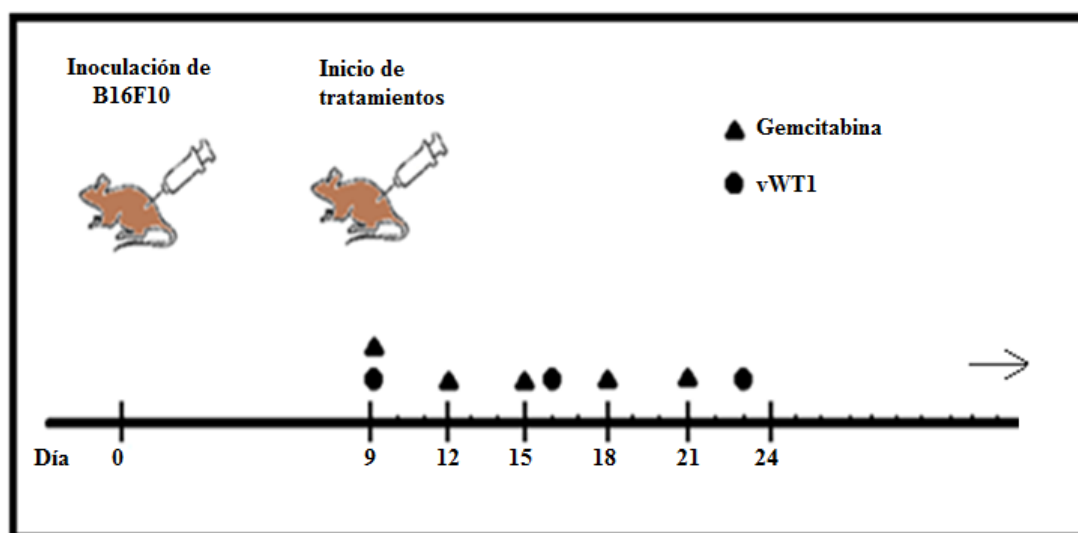


Figura 5. Esquema de tratamientos. Las concentraciones de GEM para cada grupo se especifican en el texto.

Obtención del índice tumoral

El índice tumoral se obtuvo con base en el volumen en mm^3 calculado mediante la siguiente fórmula: $((\pi)(\text{eje largo})(\text{eje corto})^2)/6$. Durante los tratamientos se fueron tomando medidas del largo y ancho de los tumores con un vernier para obtener el volumen que reflejó el índice tumoral. Los datos obtenidos se graficaron y se sometieron a un análisis estadístico para determinar si existe una diferencia significativa entre los grupos.

Prueba de supervivencia

La supervivencia fue evaluada con los grupos de tratamientos registrando las muertes de los individuos de cada grupo a medida que éstas ocurrían. Con los datos obtenidos se realizó una gráfica usando la prueba log-rank.

Análisis estadístico

Los datos de viabilidad se expresan como medias \pm DE y son representativas de 4 experimentos. La comparación entre tratamientos individuales se realizó mediante ANOVA de una vía, y las comparaciones de supervivencia mediante el método de Kaplan Meier Log-Rank con ayuda del programa SPSS Statistics ver. 17.0.

RESULTADOS

Proliferación de células B16F10 tratadas con GEM y determinación de $DL_{(50)}$.

El tratamiento de las células B16F10 con concentraciones de 1, 5, 10, 30, 50 ng/ml redujo la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis. Se observó un límite del efecto citotóxico de la GEM con las concentraciones de 100, 500 y 1000 ng/ml, este límite fue de 20% de viabilidad, por lo cual se omitieron estos valores en la gráfica (Fig. 6). No se probaron concentraciones mayores para ver si este límite persiste. Con estos resultados se obtuvo una $DL_{(50)}$ teórica de 32 ng/ml mientras que la $DL_{(50)}$ práctica fue de 25.7 ng/ml como se señala en la figura 6 con línea punteada.

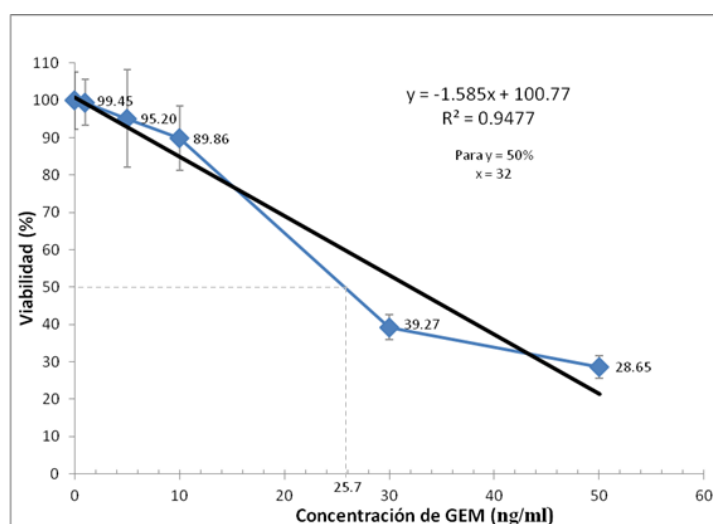


Fig. 6. Análisis de viabilidad de células B16F10 tratadas con GEM.

En otro ensayo para analizar la proliferación de células B16F10 tratadas con GEM a 24, 48 y 72h los resultados muestran que el efecto citotóxico ocurrió en las células tratadas con concentraciones superiores a 50 ng/ml de gemcitabina. En el tratamiento con 50 ng/ml se obtuvo una viabilidad celular del 40% a las 24h, valor que disminuyó al 20% a las 48 y 72h. Mientras que a concentraciones de 100, 200, 300 y 1000 ng/ml se observó una viabilidad celular cercana al 20%, valor que se mantuvo para los tres tiempos de incubación. Interesantemente el tratamiento con concentraciones de 2.5, 5, 7.5 y particularmente 10 ng/ml de gemcitabina indujeron

una mayor proliferación que el control sin tratamiento, lo cual ocurrió únicamente a las 48 h, ya que a las 24 y 72 h la proliferación celular fue menor que en el control (Fig. 7).

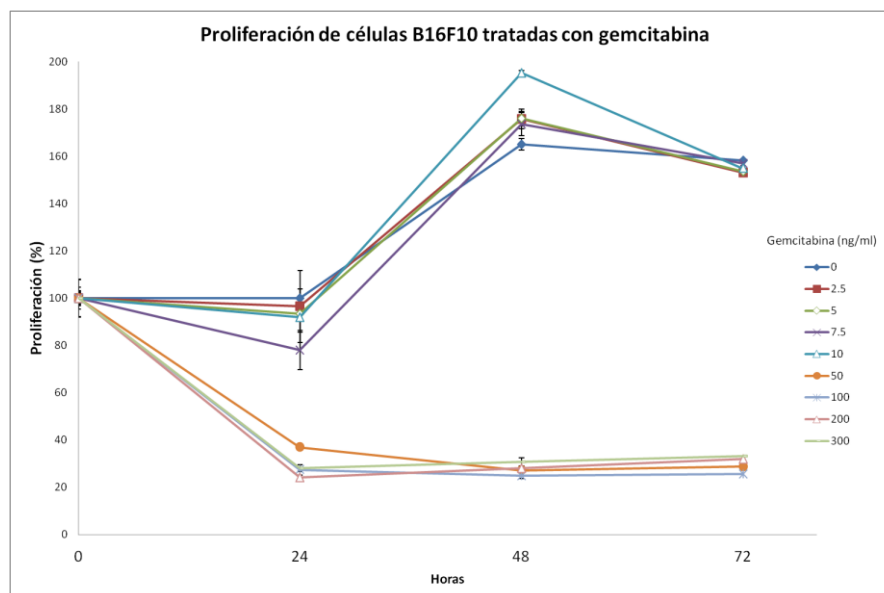


Fig. 7. Proliferación de células B16F10 tratadas con GEM.

Modulación de la expresión de *WT1* por la GEM.

Para determinar si la viabilidad de las células B16F10 observada en el ensayo anterior estaba relacionada con la modulación de *WT1* por parte de GEM se realizó un Western Blot para WT1. A las 24 h de tratamiento con GEM se observó una disminución de la expresión de la proteína de WT1 con las concentraciones de 2.5, 10, 50 ng/ml y una pérdida total de la misma con la dosis de 300 ng/ml. A las 48 h se observó un resultado similar que a las 24 h con las concentraciones de 2.5 y 10 ng/ml, y una pérdida de WT1 con las concentraciones de 50 y 300 ng/ml (Fig. 8). Sin embargo, resulta interesante el hecho de que en el ensayo anterior el tratamiento de 10 ng/ml 48 h fue el que indujo mayor proliferación celular (Fig. 7), y es precisamente con esta dosis con la que observamos menor disminución de la expresión de WT1 con respecto al control, tanto a las 24 como a las 48 h.

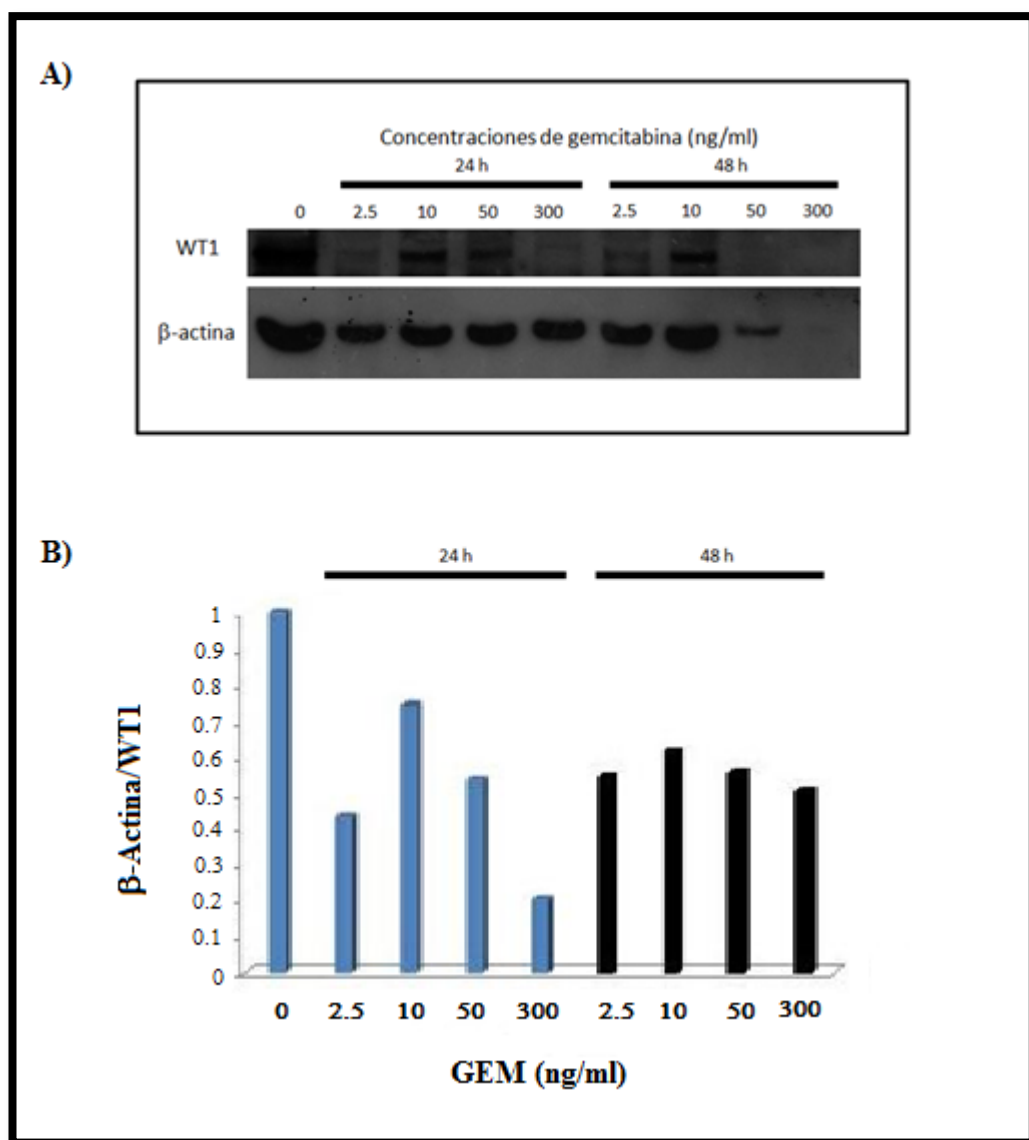


Fig. 8. Análisis de la modulación de WT1 por parte de la GEM. **A)** Bandas de proteína de WT1 y β-actina obtenidas por Western blot **B)** Análisis de densitometría que muestra la relación WT1 y β-actina.

Caracterización funcional del plásmido y producción para su uso como vacuna.

Una vez concluidos los ensayos *in vitro* se procedió a la caracterización funcional de los plásmidos H+/- y S+/- proporcionados por la doctora Ana Tari, que codifican respectivamente para las isoformas grande y pequeña de WT1. En las células transfectadas se observó un nivel 7 veces mayor de la proteína WT1 que en células control sin transfectar (Fig. 9). Lo anterior demuestra que hay expresión

exógena de WT1 y confirma la factibilidad para su uso como vacuna de DNA al codificar correctamente para el antígeno tumoral.

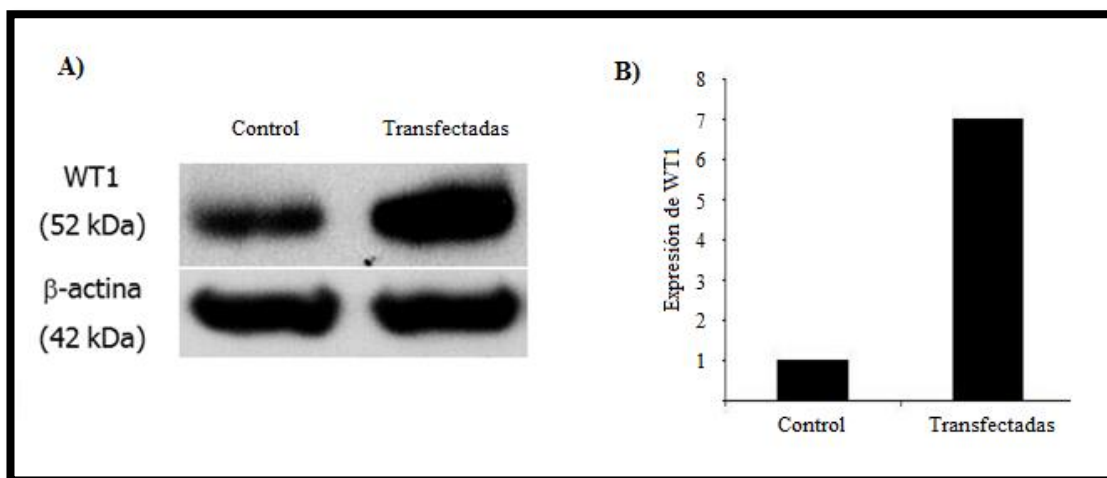


Fig. 9. Sobreexpresión de WT1 en células transfectadas con 4µg del plásmido. **A)** Bandas de proteínas β-Actina y WT1 detectadas por Western Blot. **B)** Análisis de densitometría de las bandas en A).

Una vez confirmada la funcionalidad de los plásmidos, se realizaron varias extracciones del plásmido S+/-, obteniéndose lo reportado en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de plásmido S+/- obtenidas de 4 purificaciones.		
TUBO	CONCENTRACIÓN (PROMEDIO)	RELACIÓN 260/ 280
1	330 µg / 190 µL	1.92
2	124 µg/180 µL	1.98
3	238 µg/190 µL	1.94
4	33 µg/90 µL	1.92

Las concentraciones y relaciones DNA/RNA demuestran una buena producción y pureza del plásmido para su uso como vacuna en el modelo *in vivo*.

Detección de anticuerpos contra WT1

Para evaluar la funcionalidad de la vacuna *in vivo* se analizó la presencia de anticuerpos específicos contra WT1 mediante un Dot Blot. Los resultados muestran que en el suero de ratón tratado con la vacuna hay producción de anticuerpos anti-WT1 (Fig. 10).

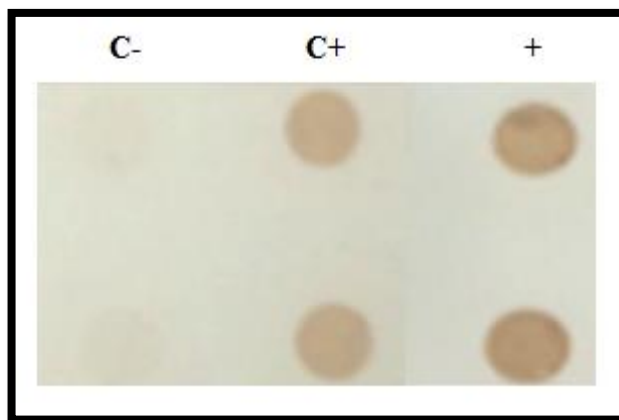


Fig. 10. Detección de anticuerpos específicos contra WT1 mediante Dot Blot. C-. Control de la técnica sin anticuerpo primario; C+. Control positivo con anticuerpo primario monoclonal de ratón contra WT1, 1:500, (Sigma Aldrich); +. Suero de ratón inmunizado con una dosis única de 10 μ g de plásmido en aerosol.

Cálculo del índice tumoral y monitoreo del peso de los ratones

El índice tumoral representa el tamaño del tumor calculado en mm^3 a partir de las medidas de largo y ancho de la masa tumoral. A lo largo del experimento se monitoreó tanto el peso total de los ratones como el índice tumoral para utilizarlos como indicadores de la respuesta antitumoral. De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que en el grupo control se registraron tumores más grandes desde la segunda medición realizada al día 12. A este día los tumores de los grupos con tratamiento tenían tamaños de 560 y 667 mm^3 respectivamente para los grupos GEM120vWT1 y GEM120, y 322 mm^3 para el grupo GEM10vWT1, mientras que para el grupo control el tumor ya alcanzaba los 2266 mm^3 . Los dos tratamientos en los que se administraron 120 mg/kg de GEM arrojaron resultados similares ya que al día 21 el índice tumoral fue de 1637 mm^3 para GEM120vWT1 y de 1727 mm^3 para

GEM120, no habiendo diferencia entre el efecto de ambos tratamientos sobre el volumen tumoral, pero sí entre estos y los dos grupos restantes (Control y GEM10vWT1) en los que se observa un crecimiento casi exponencial del tumor, al menos hasta el día 18 en el caso del grupo control pero fácilmente detectable en el grupo GEM10vWT1 a lo largo de todo el experimento. Aunque este último grupo es el que presenta el mayor índice tumoral con 4506 mm³ al momento de la última medición (día 21), en el grupo control ya se había registrado un volumen promedio del tumor de 4348 mm³ tres días antes, y si bien hay una disminución aparente en el volumen tumoral del grupo control al día 21, ésta parece no ir conforme a la cinética tumoral observada en este grupo en los días anteriores (Fig.11).

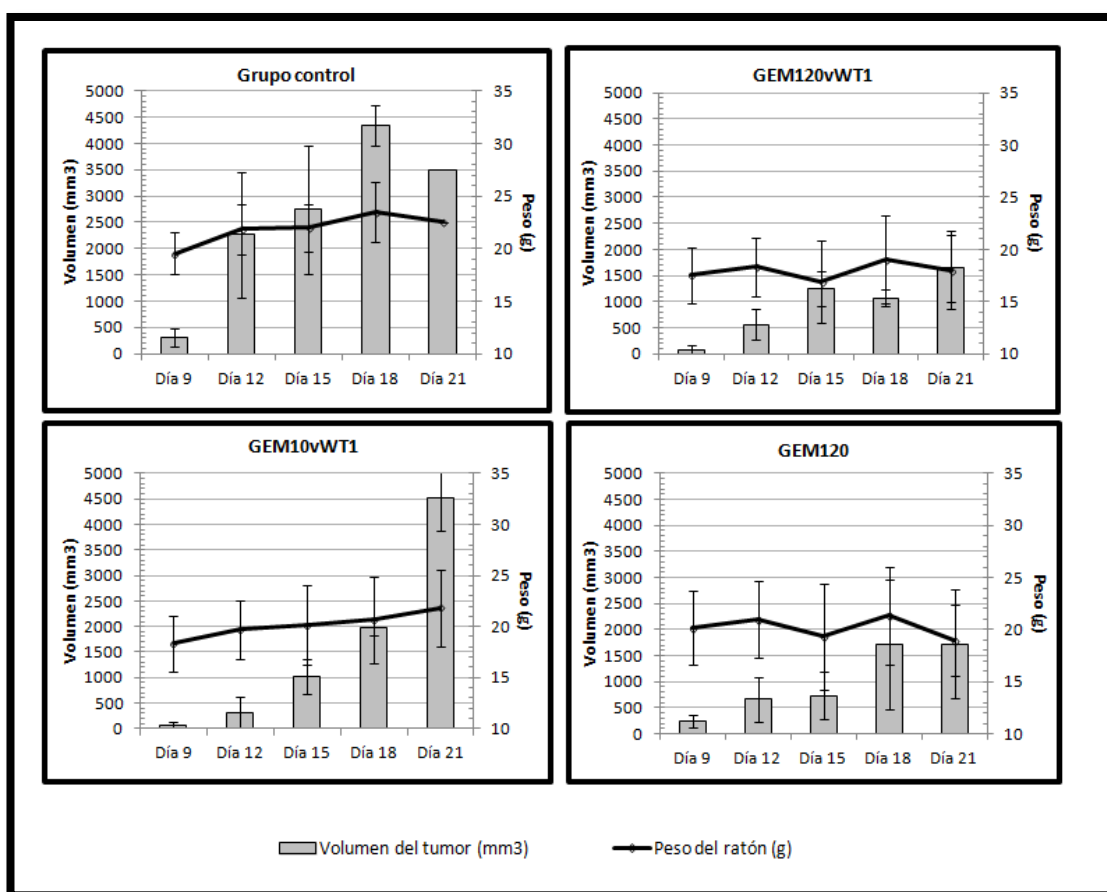


Fig. 11. Monitoreo del peso promedio del ratón y del tamaño promedio del tumor en cada grupo. **GEM120vWT1**: GEM 120 mg/kg más vWT1; **GEM10vWT1**: GEM 10 mg/kg más vWT1; **GEM120**: GEM 120 mg/kg.

Todos los grupos tuvieron un peso inicial promedio distinto (Control = 19.53 g; GEM120vWT1 = 17.55 g; GEM10vWT1 = 18.33 g; GEM120 = 20.18 g), lo cual no fue relevante al momento de comparar la cinética de peso entre grupos ya que no hay evidencia significativa de que un grupo en particular haya ganado o perdido más peso que otro ($p=0.6$) (Fig 12).

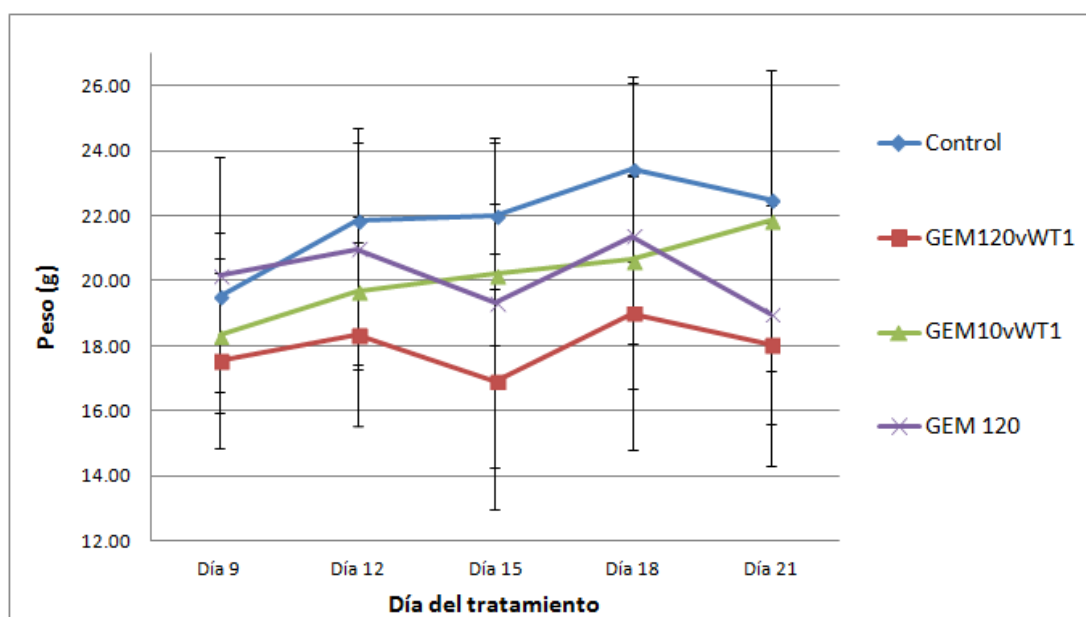


Fig. 12. Cinética de peso promedio de los ratones de cada grupo.

Sin embargo, en la última medición realizada al día 21, los grupos tratados con la dosis más alta de quimioterapia son los que presentaron menos aumento (0.5 g para GEM120vWT1) e incluso disminución de peso (-1.2 g para GEM120), mientras que en los otros dos grupos se observó un aumento de 2.97 g para el grupo Control y 3.5 g para GEM10vWT1, esto con respecto al peso promedio que tenía cada grupo al comenzar los tratamientos. A pesar de no ser significativas, estas variaciones de cada grupo se correlacionan con la toxicidad de su respectivo tratamiento (Fig. 13).

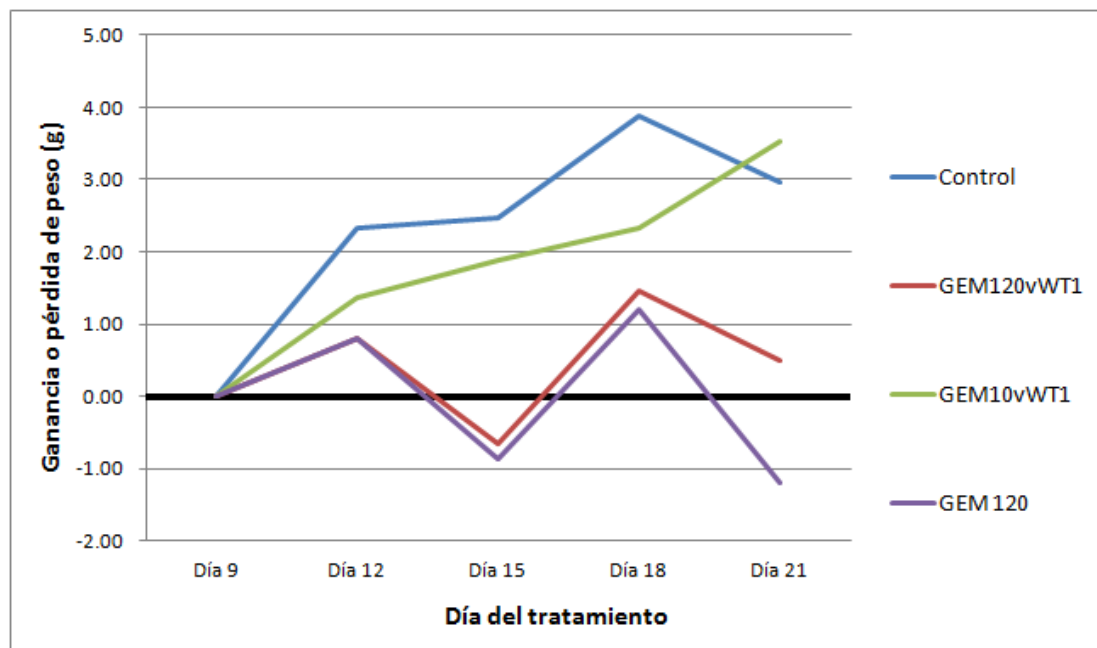


Fig. 13. Monitoreo de la pérdida o ganancia de peso de cada grupo con respecto al peso promedio de los mismos al inicio de los tratamientos (día 9).

Análisis de supervivencia

Durante y después de la aplicación de los tratamientos y con la finalidad de evaluar el efecto de los mismos sobre la supervivencia se le dio seguimiento a los ratones de cada grupo, registrando la muerte de cada individuo conforme esta iba ocurriendo. La curva obtenida con esos datos señala que el único tratamiento con el que se observó una sobrevida significativamente mayor que la del grupo control, cuya media de supervivencia fue de 20.33 ± 1.63 días, fue GEM10vWT1 ($P = 0.003$, media 30.5 ± 4.6 días). Con el tratamiento GEM120vWT1, se registró una media de supervivencia de 25.87 ± 9.46 días, lo cual, al igual que en el tratamiento GEM120 (media = 22.2 ± 4 días), no alcanzó a ser significativamente diferente que el grupo control ($P = 0.15$ para ambas comparaciones). La supervivencia obtenida con el tratamiento GEM10vWT1 también fue significativamente mayor que la del tratamiento GEM120 ($P = 0.032$) (Fig. 14).

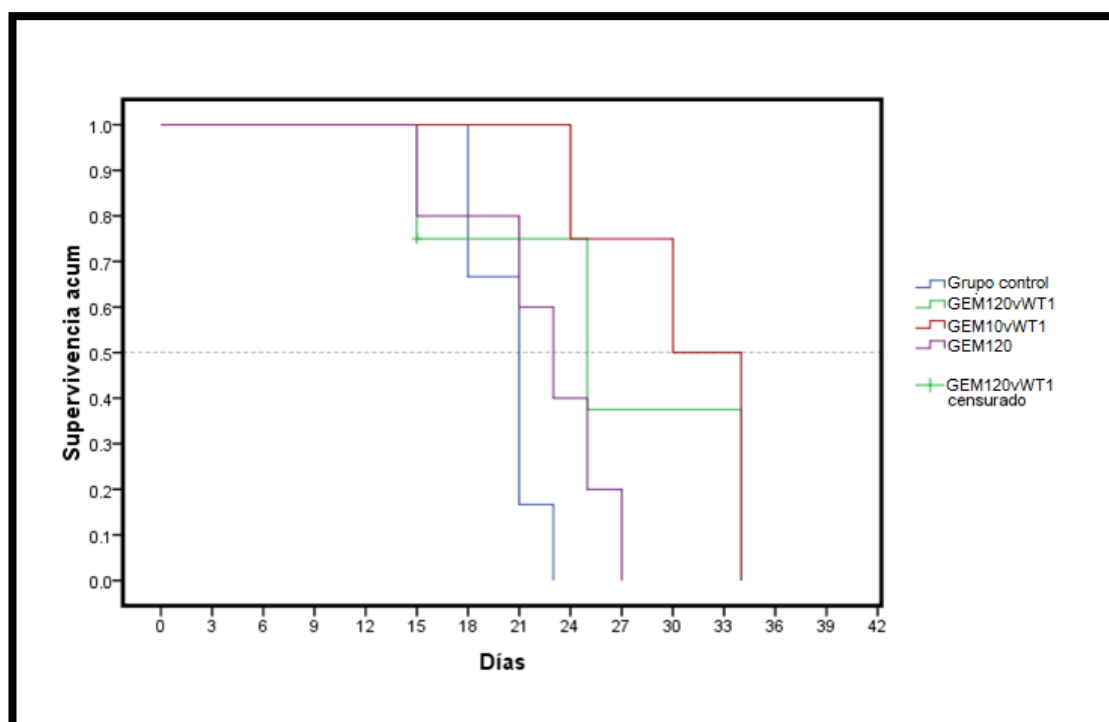


Fig. 14. Curva de supervivencia de los ratones de cada grupo. Los tratamientos iniciaron al día 9. **Grupo control:** cloruro de sodio 0.9 %, 100 µl; **GEM120vWT1:** GEM 120 mg/kg junto con 1 µg de (S +/-); **GEM10vWT1:** GEM 10 mg/kg junto con 1 µg de (S+/-); **GEM120:** GEM 120 mg/kg. (GEM y cloruro de sodio: i.p. cada 3 días hasta completar 5 aplicaciones. Vacuna de ADN (S +/-): s.c. cada 7 días hasta 3 aplicaciones.)

DISCUSIÓN

Muchos estudios clínicos y preclínicos han demostrado que la combinación de dos o más tratamientos contra el cáncer puede ser más efectiva que cada uno de ellos por separado (Pandha *y col.*, 2009; Shaked *y col.*, 2008; Corrie *y col.*, 2005; Nowak *y col.*, 2003; Keilholz *y col.* 1997); sin embargo, no suele considerarse a la activación de la respuesta inmunológica como un tratamiento que pueda combinarse con otros, como la radio y quimioterapia, debido a que se asume ampliamente que la inmunosupresión provocada por estos últimos impide esa posibilidad. No obstante, al contrario de estas expectativas también se ha comprobado que algunos agentes quimioterapéuticos tales como doxorrubicina, cisplatino, bleomicina y GEM tienen propiedades inmunomoduladoras inherentes, por ejemplo: reducción de poblaciones de células reguladoras, aumento de la expresión de antígenos tumorales, promoción de la expresión de Fas para sensibilizar al tumor a linfocitos T CD8⁺ y NK, potenciación de la actividad de macrófagos al inducir la producción y secreción de óxido nítrico y aniones súper óxido; todo esto contribuyendo a la inmunidad antitumoral (Baxevanis *y col.*, 2008; Suzuki *y col.*, 2007).

Debido a la alta toxicidad asociada a los esquemas de combinación de quimioterapia, se ha buscado el uso alternativo de compuestos no tóxicos con mecanismos de acción diferentes que complementen el efecto terapéutico y/o ayuden a reducir la dosis de los agentes tóxicos (Dong-Wong, A. *y col.*, 2012). Como una de estas alternativas están las vacunas de ADN que codifican para antígenos específicos asociados a tumor y con las cuales es posible la inmunización y obtención de una buena respuesta inmunológica humoral y celular contra estos antígenos (Lladser, A. *y col.*, 2005).

WT1 es considerado como un importante antígeno asociado a tumor en una amplia gama de tumores sólidos y hematopoyéticos (Keilholz, U. *y col.*, 2005; Asgarian, H. *y col.*, 2005; Inowe K. *y col.* 1994), y es un excelente blanco potencial para el desarrollo de estrategias de vacunación con ADN en el tratamiento del cáncer debido a que se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de neoplasias (Wagner, N. *y col.* 2008; Oji, J. *y col.* 1999).

Por todo esto, en el presente trabajo se consideró utilizar una vacuna de ADN basada en WT1 en combinación con GEM para ver si esta combinación tiene un efecto sinérgico en la respuesta antitumoral en un modelo de melanoma murino.

Primero se evaluó la citotoxicidad de la GEM sobre la línea celular B16F10 obteniendo una $DL_{(50)}$ de 32 ng/ml. Este dato es semejante a lo reportado por Suzuki y col. (2007) quienes obtuvieron una $DL_{(50)}$ de 30 ng/ml en la misma línea celular. Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la proliferación de células B16F10 es directamente proporcional a la expresión del gen *WT1* (Zamora-Ávila D.E., 2007) y en otros estudios se ha observado que la GEM tiene la capacidad de modular positivamente su expresión en líneas celulares de cáncer de páncreas en tiempos y dosis específicos (Takahara y col., 2011). Por lo anterior se realizó un ensayo para analizar la proliferación de células B16F10 tratadas con GEM a 24, 48 y 72 h para analizar los niveles de expresión de WT1 mediante Western Blot y ver si esta modulación también está presente en células B16F10. En el ensayo de proliferación, con las dosis de 50, 100, 200 y 300 ng/ml se redujo la viabilidad al 40 % o menos desde las 24 h y hasta las 72 h, indicando que no hay una dosis respuesta en este rango de concentraciones ni en relación al tiempo, en tanto que con los tratamientos de bajas dosis (2.5, 5, 7.5 y 10 ng/ml) de GEM a las 48 h se observó un ligero incremento en el número de células vivas comparado con el control, sin embargo a las 72 h de estas dosis ocurrió un efecto similar al control. Se especuló que el incremento en la proliferación a las 48 h era debido a la acción de *WT1* que estaba siendo modulado positivamente por la GEM como sucede en las líneas de cáncer de páncreas, pero en los resultados del Western Blot se observa que la GEM no modula positivamente a *WT1* en la línea celular B16F10 sino que disminuye su expresión, esto se observó tanto a las 24 h como a las 48 h con dosis de 2.5, 10, 50 y 300 ng/ml; por lo tanto, el mecanismo por el cual se dio un aumento en la proliferación con las dosis bajas de GEM a las 48 h parece no estar relacionado con la actividad de WT1.

Nuestra hipótesis fue que niveles altos de WT1 ayudarían a un mayor procesamiento de la misma y a la presentación de antígenos que pudieran facultar al sistema inmunológico para montar una respuesta antitumoral específica. Sin embargo de acuerdo a nuestros resultados esto no ocurre en células B16F10 tratadas sólo con

GEM. La vacunación con el plásmido WT1 S+/- es una pieza clave para la inmunización de los ratones debido a que su expresión se inicia en un sitio cercano a la región más antigénica, que corresponde al aminoácido 126 donde se encuentra el epítotope inmunodominante “RMFPNAPYL”, que induce una fuerte respuesta de tipo celular y además posee secuencias estimuladoras de la respuesta humoral. Con la prueba de Dot Blot se demostró que al utilizar la vacuna en ratones es posible activar una respuesta inmune humoral ya que esta vacuna fue efectiva para producir anticuerpos específicos contra WT1, dando una prueba indirecta de que podrían activarse también mecanismos celulares capaces de combatir al tumor mediante presentación cruzada del antígeno en contexto de MHC I (Mota-Sánchez J., 2009). La activación de la respuesta celular es de gran importancia ya que es la principal para atacar al tumor. Por lo tanto, a pesar de que se logró obtener anticuerpos específicos contra WT1, en el modelo murino de melanoma no se esperaba que este tipo de respuesta tuviera un efecto antitumoral importante, más aún cuando existen estudios que demuestran que el tratamiento con GEM disminuye poblaciones de linfocitos T y B pero afecta selectivamente a linfocitos B, inhibiendo con ello la producción de anticuerpos contra un antígeno específico; pero a pesar de esto, es importante destacar que el tratamiento con GEM no obstaculiza la función de linfocitos T citotóxicos contra ese mismo antígeno (Nowak y *col.*, 2002).

Dado que en el modelo murino de melanoma no se encontró diferencia entre el índice tumoral del tratamiento único con GEM y el de la combinación de la misma dosis de GEM más vacuna, estos resultados indican que la efectividad de la vacuna para generar una respuesta antitumoral no fue la suficiente como para distinguir el efecto del tratamiento combinado del efecto único de la GEM bajo el esquema de aplicación empleado (120 mg/kg, 1 aplicación cada 3 días hasta 5 aplicaciones), con el cual se ha demostrado que se obtiene la mejor respuesta antitumoral (Braakhuis y *col.*, 1991; Hertel y *col.*, 1990); por lo tanto, no existe sinergia entre estas terapias para reducir el tamaño del tumor en melanoma murino B16F10 con el esquema de tratamiento utilizado. Es importante mencionar que aunque este esquema de administración de GEM es el mejor cuando se usa como único agente, puede que no lo sea cuando se utiliza en combinación con inmunoterapia. En el esquema utilizado se tiene contemplado que haya muerte de células tumorales por necrosis/apoptosis

ocasionada directamente por las sucesivas aplicaciones de GEM ayudando con esto a un aumento en el procesamiento y la presentación de antígenos. Sin embargo, hay otro estudio en el que se administra una única dosis de GEM de 120 mg/kg para tratar diferentes tumores murinos obteniéndose resultados favorables (Suzuki y *col.*, 2007). En ese estudio la eficacia de la GEM no tuvo relación con la sensibilidad observada *in vitro*, sino a la inmunogenicidad del tumor. Esto fue confirmado utilizando ratones desnudos (que carecen de células T) en los cuales se perdía el efecto de la dosis única de GEM, y también utilizando animales a los que se inoculó con tumores resistentes a GEM manteniéndose el efecto de esta dosis. Lo anterior indica que hay un efecto antitumoral de la GEM independiente de su actividad citotóxica. Estos datos podrían servir para elaborar un nuevo esquema de aplicación que permita aprovechar al máximo el efecto inmunomodulador de la GEM, reduciendo el número de aplicaciones o disminuyendo la dosis.

Los tumores generados a partir de células B16F10 se consideran no inmunogénicos, por lo tanto se requiere la acción citotóxica de la GEM para ayudar a producir una respuesta inmune. En este trabajo se observó que la toxicidad de la GEM tiene un efecto importante sobre la supervivencia de los ratones ya que, de todos los tratamientos, el grupo tratado sólo con GEM tuvo la supervivencia más corta (apenas 2 días más que la media del grupo control sin tratamiento) a pesar de que el índice tumoral de este grupo no fue tan alto como los de los grupos Control y GEM10vWT1. Por otra parte, resulta interesante que los dos grupos tratados con la vacuna fueron los que presentaron una mayor supervivencia que el control, siendo el grupo tratado con la dosis más baja de GEM (10 mg/kg) en el que se registró la mayor supervivencia, la cual fue significativamente diferente de la del grupo control y del grupo tratado solo con GEM. Este aumento en la supervivencia (10 ± 4.6 días) se dio aún cuando el volumen tumoral fue casi igual al del grupo control. Por lo tanto, la combinación de GEM con la vacuna contra WT1 debe estar influyendo de alguna manera para prolongar la vida de los ratones. Para estar seguros de esto se tendría que probar un tratamiento con la dosis baja de GEM pero sin la vacuna contra WT1, con lo cual se confirmaría si el efecto en la supervivencia fue debido únicamente a la baja toxicidad de la dosis o si realmente la vacuna es la que aporta a la supervivencia. El tratamiento GEM120vWT1 tuvo el índice tumoral más bajo y

una supervivencia que sólo fue superada por el tratamiento GEM10vWT1, lo cual lo sitúa en un estado intermedio entre supervivencia y reducción del tumor. Al hacer algunas modificaciones a este tratamiento podrían obtenerse mejores resultados, probablemente reduciendo un poco la dosis para mantener el efecto citotóxico con el mismo esquema de aplicación, y aumentando la cantidad de plásmido administrada o probando vías alternas de administración del mismo (intramuscular, intradérmica o en aerosol).

Todo esto da cuenta de lo heterogéneo que resulta el cáncer y de lo preciso que tiene que ser un tratamiento, ya que los mecanismos que pueden estar presentes en una neoplasia y que hacen que un enfoque terapéutico tenga éxito pueden no estar presentes en otros tumores, como en este caso en el que se tenían antecedentes de que la GEM modulaba positivamente a *WT1* en líneas celulares de cáncer de páncreas pero no se detectó esto en la línea celular B16F10, incluso Takahara y *col.* (2011) mencionan que en 2 de las 7 líneas celulares estudiadas tampoco se observa esta modulación. Así mismo Suzuki y *col.* (2007) sostienen que B16F10 no es un tumor con capacidad inmunogénica y que debido a eso la dosis única de GEM de 120 mg/kg que ellos emplearon, y que no alcanza a producir necrosis o apoptosis del tumor, no tuvo efecto en la eliminación del mismo, a diferencia de otros tumores en los que sí se obtuvo éxito con la misma dosis, sugiriendo que el uso de inmunoterapia contra B16F10 podría no tener buenos resultados. Por lo tanto, es importante tener en consideración que las respuestas obtenidas con cada tratamiento casi siempre son específicas del tipo de tumor y podrían no ser de utilidad al emplear esos tratamientos en otros modelos.

CONCLUSIONES

No se detectó sinergia con el tratamiento combinado de GEM y vacuna de WT1 para la reducción de tumores de B16F10 en ratones C57BL6.

La GEM no modula positivamente la expresión de WT1 en células B16F10 *in vitro* a ninguno de los tiempos y dosis empleados.

La vacunación con el plásmido S(+/-) es capaz de producir una respuesta humoral contra la proteína WT1 en ratones inmunizados.

Los ratones cuyo tratamiento incluía la dosis de GEM 120 mg/kg tuvieron un índice tumoral menor que los ratones de los grupos restantes, pero esto no se correlacionó con la supervivencia.

El tratamiento combinado con la vacuna y GEM 10 mg/kg aumentó significativamente la supervivencia de los ratones aunque no fue efectivo para reducir el tumor.

PERSPECTIVAS

Para complementar esta investigación podrían realizarse ensayos en los que se aplique únicamente el tratamiento con la dosis de GEM de 10 mg/kg y con ello verificar si esta dosis por sí sola da los mismos resultados de supervivencia que los obtenidos en este estudio bajo el esquema de combinación con la vacuna de WT1. Con esto se aclararía si realmente la vacuna es la que aporta a la supervivencia y calidad de vida, o sólo es el efecto de la menor toxicidad por la dosis baja.

Asimismo se podrían probar otros esquemas de aplicación de los tratamientos con el objetivo de encontrar la mejor combinación de dosis e intervalos de tiempo con los cuales se aprovechen al máximo las propiedades inmunomoduladoras y citotóxicas de la vacuna de WT1 y GEM.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan bases para aplicar esta combinación de quimioterapia e inmunoterapia en otros modelos experimentales de cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

Abbruzzese, J. 2002. New Applications of Gemcitabine and Future Directions in the Management of Pancreatic Cancer. *Cancer*. 95: 941-945.

American Cancer Society. 2008. *Cancer Facts & Figures 2008*. Atlanta: American Cancer Society.

Anderson CM, Buzaid AC and Legha SS. 1995. Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma. *Oncology (Huntingt)*. 9:1149-1158.

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. 2011. Superior Preclinical Efficacy of Gemcitabine Developed As Chitosan Nanoparticulate System. *Biomacromolecules*. 12: 97–104.

Asgarian H, Sabani M, Vosoogh P, Sharifan RA, Gharagozlou S, Khoshnoodi J, Shahrestani T, Kordmahin M, Sarrafnejad A, Tehrani MJ, Rabbani H, Shokri F. 2005. Over-expression of Wilm's tumor gene 1 (WT1) in Iranian patients with acute myeloblastic leukemia. *IJI*. 4:182-190.

Atkins M, Lee S, Flaherty LE, Sosman JA, Sondak VK and Kirkwood JM. 2003. A prospective randomized phase III trial of concurrent biochemotherapy (BCT) with cisplatin, vinblastine, dacarbazine (CVD), IL-2 and interferon alpha-2b (IFN) versus CVD alone in patients with metastatic melanoma (E3695): An ECOG-coordinated intergroup trial. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 22:708.

Austoker J. 1994. Melanoma: Epidemiología y diagnóstico precoz. *BMJ*. 2:408-413.

Babiarova K, Kutinova L, Zurkova K, Krystofova J, Brabcova E, Hainz P, Musil J, Nemeckova S., 2012. Immunization With WT1-derived Peptides by Tattooing Inhibits the Growth of TRAMP-C2 Prostate Tumor in Mice. *J Immunother*. 35:478–487.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA and Thompson JF.

2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 19:3635-3648.

Ballo M, Ang KK. 2003. Radiation therapy for malignant melanoma. *Surg Clin North Am.* 83: 323-342.

Brady MS. 2004. Sentinel lymph node mapping in patients with cutaneous melanoma. *Dermatol Surg.* 30:272-278.

Braakhuis B.J.M., van-Dongen J.A.M.S., Vermorken J.B., Snow G.B. 1991. Preclinical in vitro activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) against human head and neck cancer. *Cancer Research.* 51:211-214.

Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. 2001. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 29:1247-1255.

Caudill MM, Li Z. 2001. HSPPC-96: A personalised cancer vaccine. *Expert Opin Biol Ther* 1:539-547.

Chabner BA, García-Carbonero R, Ryan DP. 2005. Cytidine Analogs. In: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Principles and Practice.* Lippincott Williams & Wilkins. pp. 200-204.

Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm M. 1969. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 29: 705-726.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Jean-Luc R, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M, 2012. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 364:1817-25.

Coulie PG. 1997. Human tumor antigens recognized by T cells: new perspectives for anti-cancer vaccines? *Molecular. Med Today* 3:261-268.

Del Vecchio MM, Bajetta E, Vitali M, Gattinoni L, Santinami M, Daponte A, Sertoli MR, Queirolo P, Bernengo MG and Cascinelli N. 2003. Multicenter phase

III randomized trial of cisplatin, vindesine and dacarbazine (CVD) versus CVD plus subcutaneous (sc) interleukin-2 (IL-2) and interferon-alpha-2b (IFN) in metastatic melanoma patients (pts). *Proc Am Soc Clin Oncol*. 22:709.

Denninghoff V, Falco J, Curutchet HP and Elsner B. 2006. Estudio del ganglio centinela, Diagnóstico y tratamiento del Melanoma Maligno Cutáneo, estadios I y II. *MEDICINA (Buenos Aires)*. 66:144-146.

Desmond RA and Soong SJ. 2003. Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Clin North Am*. 83:1-29.

Drugs RD. 2006. Sipuleucel-T: APC 8015, APC-8015, prostate cancer vaccine--Dendreon. 7:197-201.

Dubois RW, Swetter SM, Atkins M, McMasters K, Halbert R, Miller SJ, Shiell R and Kirkwood J. 2001. Developing indications for the use of sentinel lymph node biopsy and adjuvant high-dose interferon alpha-2b in melanoma. *Arch Dermatol*. 137:1217-1224.

Ferrándiz, C. 2001. *Dermatología clínica*. Elsevier. Madrid, España. pp. 363-364.

Fisher RI, Neifeld JP and Lippman ME. 1976. Estrogen receptors in human malignant melanoma. *Lancet*. 2:337-338.

Fong L, Brockstedt D, Benike C, Breen JK, Strang G, Ruegg CL, Engleman EG. 2001. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol* 167:7150-7156.

Fuentes-Paredes FM, Mendoza-Yanavilca RA, Rosales-Fernández AL, Cisneros-Tarmeño RA. 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Centro Nacional de Productos Biológico. Perú. Págs. 1-54.

Geutskens SB. 2000. Recombinant adenoviral vectors have adjuvant activity and stimulate T cell responses against tumor cells. *Gene Ther* 7:16410-16416.

Glienke W, Maute L, Koehl U, Esser R, Milz E and Bergmann L. 2007. Effective treatment of leukemic cell lines with WT1 siRNA. *Leukemia*. 21:2164-2170.

Goldstein BG and Goldstein AO. 2001. Diagnosis and management of malignant melanoma. *Am Fam Physician*. 63:1359-1368.

Greene M. 1999. The genetics of hereditary melanoma and nevi. *Cancer*. 86:2464-2477.

Grin CM, Kopf AW, Welkovich B, Bart RS and Levenstein MJ. 1990. Accuracy in the clinical diagnosis of malignant melanoma. *Arch Dermatol*. 126:763-766.

Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM and Housman DE. 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 88:9618-9622.

Han Y, Yang L, Suárez-Saiz F, San-Marina S, Cui J and Minden MD. 2008. Wilm's tumor 1 suppressor gene mediates antiestrogen resistance via down-regulation of estrogen receptor- α expression in breast cancer cells. *Mol Cancer Res*. 6:1347-1355.

Hertel L.W., Boder G.B., Kroin J.S., Rinzel S.M., Poore G.A., Todd G.C., Grindey G.B. 1990. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Research*. 50:4417-4422.

Heymann WR. 2004. The genetics of melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 51:801-802.

Hirose M. 1999. The role of Wilm's tumor genes. *J Med Invest*. 46:130-140.

International Agency for Research on Cancer. 2002. GLOBOCAN. *Cáncer Mundial*. Disponible en: <http://www-dep.iarc.fr/>

Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Masaoka T, Nasu K, Kyo T, Dohy H, Nakauchi H, Ishidate T, Akiyama T, Kishimoto T. 1994. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 84:3071-3079.

Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, Wingo PA, Howe HL, Anderson RN and Edwards BK. 2004. Annual Report to the Nation on the

status of cancer, 1975-2001, with special feature regarding survival. *Cancer*. 101(1):3-27.

Kaida M, Morita-Hoshi Y, Soeda A, Wakeda T, Yamaki Y, Kojima Y, Ueno H, Kondo S, Morizane C, Ikeda M, Okusaka T, Takaue Y, Heike Y. 2011. Phase 1 Trial of Wilms Tumor 1 (WT1) Peptide Vaccine and Gemcitabine Combination Therapy in Patients With Advanced Pancreatic or Biliary Tract Cancer. *J Immunother* 2011;34:92–99.

Keilholz U, Goey SH, Punt CJ, Proebstle TM, Salzmänn R, Scheibenbogen C, Schadendorf D, Lienard D, Enk A, Dummer R, Hantich B, Geueke AM and Eggermont AM. 1997. Interferon alfa-2a and interleukin-2 with or without cisplatin in metastatic melanoma: a randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 15:2579-2588.

Keilholz U, Menssen HD, Gaiger A, Menke A, Oji Y, Oka Y, Scheibenbogen C, Stauss H, Thiel E, Sugiyama H. 2005. Wilms' tumor gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia*. 19:1318-1323.

Kraehn M, Scharl M and Peter R. 1994. Human melanoma: a genetic disease? *Cancer*. 75: 1228-1237.

Lee SB and Heaver DA. 2001. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell*. 264:74-99.

Legha SS, Ring S, Bedikian A, Plager C, Eton O, Buzaid AC and Papadopoulos. 1996. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann Oncol*. 7:827-835.

Legha SS. 1989. Current therapy for malignant melanoma. *Semin Oncol*. 16:34-44.

Leitner RMC. 2006. Epidemiología del melanoma cutáneo. *Rev Argent Dermatol*. 87:86-97.

- Lens MB, Reinam T and Husain AF. 2003. Use of tamoxifen in the treatment of malignant melanoma. Systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Cancer*. 98:1355-1361.
- Lewandrowski CC and Demierre MD. (2000). Advances in specific immunotherapy of malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 43:167-185.
- Lipton A, Harvey HA, Lawrence B, Gottlieb R, Kukrika M, Dixon R, Graham W, Miller S, Heckard R, Schelzel D and White DS. 1983. *Corynebacterium parvum* versus BCG adjuvant immunotherapy in human malignant melanoma. *Câncer*. 51:57-60.
- Little M and Wells C. 1997. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat*. 9:209–225.
- Liu V and Mihm MC. 2003. Pathology of malignant melanoma. *Surg Clin North Am*. 83: 31-60.
- Livingston PO. 1997. Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. *Rationale. Cancer Immunol Immunother* 45:1-9.
- Lladser A., Párraga M., Quevedo L., Molina MC, Silva S, Ferreira A, Billeta R, Quest AFG. 2005. Naked DNA immunization as an approach to target the generic tumor antigen surviving induces humoral and cellular immune responses in mice. *Immunobiology*. 211:11-27.
- MacKie RM (1998). Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer*. 34:3-6.
- Martinez J and Otley C. 2001. The management of melanoma and non melanoma skin cancer: a review for the primary care physician. *Mayo Clinic Proc*. 76:1253-1265.
- Martínez-Saíd H, Cuellar-Hubbe M, Barrón Velásquez E, Padilla RA, Herrera-Gómez A, López Graniel CM, De la Garza SJ and Mohar-Betancourt A. 2004. Epidemiology of cutaneous melanoma in México (1980-2002). *Eur J Surg Oncol*. 30:163.

Mellman I, Coukos G, Dranoff G. 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 480: 480-489.

Menke AL, Van der Eb AJ and Jochemsen AG. 1998. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int. Rev. Cytol.* 181:151-212.

Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, Kawano K, Kuwae Y, Yamauchi A, Okumura M, Kitamura Y, Oka Y, Kawase I, Sugiyama H and Aozasa K. 2006. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern Pathology*. 19:804–814.

O'Day SJ, Kim CJ and Reintgen DS. 2002. Metastatic melanoma: chemotherapy to biochemotherapy. *Cancer Control*. 9:31-38.

Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim EH, Soma T, Tatekawa T, Kawakami M, Asada M, Kishimoto T and Sugiyama H. 1999. Expression of the Wilm's tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res*. 90:194-204.

Okusaka, *et al.*, 2012. Possibility of immunotherapy for biliary tract cancer: how do we prove efficacy? Introduction to a current ongoing phase I and randomized phase II study to evaluate the efficacy and safety of adding Wilms tumor 1 peptide vaccine to GEM and cisplatin for the treatment of advanced biliary tract cancer (WT-BT trial). *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 11: 4951-501.

Padhye SS, Guin S, Yao HP, Zhou YQ, Zhang R, Wang MH. 2011. Sustained Expression of the RON Receptor Tyrosine Kinase by Pancreatic Cancer Stem Cells as a Potential Targeting Moiety for Antibody-Directed Chemotherapeutics. *Mol. Pharmaceutics*. 8: 2310–2319.

Peachman KK, Rao M and Alving CR. 2003. Immunization with DNA through

Perry BN, Cohen C, Govindarajan B, Colsonis G and Arbiser J. 2006. Wilms tumor 1 expression present in most melanomas but nearly absent in nevi. *Arch Dermatol*. 142:1031–1034.

Piepkorn M. 2000. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol*. 42:705-723.

Puig S, Malveyh J, Badenas C, Ruiz A, Jiménez D, Cuéllar F, Azon A, González U., Castel T, Campoy A, Herrero J, Martí R, Brunet-Vidal J and Milá M. 2005. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol.* 23:3043-3051.

Rauscher FJ.1993. The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *The FAUSEB Journal.* 7:896-903.

Reddy H, Renoir JM, Marsaud V, Lepetre-Mouelhi S, Desmaële D, Couvreur P. 2009. Anticancer Efficacy of Squalenoyl Gemcitabine Nanomedicine on 60 Human Tumor Cell Panel and on Experimental Tumor. *Molecular Pharmaceutics.* 5: 1526–1535.

Reed RJ, Ichinose H and Clark WH Jr. 1975. Common and uncommon melanocytic nevi and bordeline melanomas. *Semin Oncol.* 2:119-147.

Restifo NP and Lewis JJ. 2005. Therapeutic Vaccines. En: De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (editors). *Cancer. Principles and Practice of Oncology.* 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; pp 2846-2856.

Richardson SK, Tannous ZS and Mihm MC. 2002. Congenital and infantile melanoma: review of the literature and report of an uncommon variant, pigment-synthesizing melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 47:77-90.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Fay MP, Feuer EJ and Edwards BK. 2003. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Disponible en: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000/

Rodeck U, Bossler A, Kari C, Humphreys CW, Györfi T, Maurer J, Thiel E and Menssen HD. 1994. Expression of the WT1 Wilms' tumor gene by normal and malignant human melanocytes. *Int J Cancer.* 59:78-82.

Rodríguez García R, Hechavarría Miyares JH and Azze Pavón MA. 2001. Cáncer de piel y ocupación. *Revista Cubana de Medicina.* 40: 266-272.

Rosenberg SA. 1999. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode tumor antigens. *Immunity* 10:281-287.

Rosenfeld C, Cheever MA and Gaiger A. 2003. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia*. 17:1301-1312.

Saiag P, Bernard M, Beauchet A, Bafounta ML, Bourgault-Villada I and Chagnon S. 2005 . Ultrasonography using simple diagnostic criteria vs palpation for the detection of regional lymph node metastases of melanoma. *Arch Dermatol*. 141:183-189.

Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW and Bolognia JL. 2004. Cutaneous melanoma-Past, present and future. *J Am Acad Dermatol*. 51: S65-9.

Scharnhorst V, Dekker P, Van der Eb AJ and Jochemsen AG. 1999. Internal Translation Initiation Generates Novel WT1 Protein Isoforms with Distinct Biological Properties. *Jour. of Biol. Chem*. 274(33):23456–23462.

Scholz H and Kirschner KM. 2005. A Role for the Wilms' Tumor Protein WT1 in Organ Development. *Physiology*. 20:54–59.

Schumacher K. 2001. Keyhole limpet hemocyanin (KLH) conjugate vaccines as novel therapeutic tools in malignant disorders. *Cancer Res Clin Oncol* 16:93-102.

Secretaría de Salud. 2001. Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas. Compendio de Cáncer. México.

Soeda A, Morita-Hoshi Y, Makiyama H, Morizane C, Ueno H, Ikeda M, Okusaka T, Yamagata S, Takahashi N, Hyodo I, Takaue Y, Heike Y. 2009. Regular Dose of Gemcitabine Induces an Increase in CD141 Monocytes and CD11c1 Dendritic Cells in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 39:797–806.

Song X, Lorenzi PL, Landowski CP, Vig BS, Hilfinger JM, Amidon GL. 2005. Amino Acid Ester Prodrugs of the Anticancer Agent Gemcitabine: Synthesis, Bioconversion, Metabolic Bioevasion, and hPEPT1-Mediated Transport. *Molecular Pharmaceutics*. 2:157-167.

Stewart BW and Kleihues P. (Eds). 2003. World Cancer Report. IARC Press. Lyon.

Swanson NA, Lee KK, Gorman A and Han H. 2002. Biopsy techniques. Diagnosis of melanoma. *Dermatol Clin*. 20:677-680.

Takahara A, Koido S, Ito M, Nagasaki E, Sagawa Y, Iwamoto T, Komita H, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Mineno J, Shiku H, Nishida S, Sugiyama H, Tajiri H, Homma S. 2011. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother*. 60:1289–1297.

Tannous ZS, Mihm MC, Sober AJ and Duncan LM. 2005. Congenital melanocytic nevi: Clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol*. 52:197-203.

Timmerman JM and Levy R. 1999. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Ann Rev Med* 50:507-529.

Tomicic J and Wanebo HJ. 2003. Mucosal melanomas. *Surg Clin North Am*. 83:237-252.

Tsao H and Niendorf K. 2004. Genetic testing in hereditary melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 51:803-808.

Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G and Haluska FG. 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*. 122:337-341.

Van Drunen S, Gerds V, Oler BI, Pontarollo R, Rankin R, Uwiera R and Balbuk LA. 2000. Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 43:13-28.

Wagner KD, Wagner N and Schedl A. 2003. The complex life of WT1. *Journal of Cell Science*. 116:1653-1658.

Wagner N, Panelos J, Massi D and Wagner KD. 2008. The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation. *Pflugers Arch.* 455:839-847.

Walker MJ, Beattie CW, Patel MK, Ronan SM and Das Gupta TK. 1987. Estrogen receptor in malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 5:1256–1261.

Walsh P, Gibbs P and Gonzalez R. 2000. Newer strategies for effective evaluation of primary melanoma and treatment of stage III and IV disease. *J Am Acad Dermatol.* 42:480-489.

Yang L, Han Y, Suarez Saiz F and Minden MD. 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story (Review). *Leukemia.* 21:868–876.

Zhu D, Rice J, Savelyeva N, Stevenson SK. 2001. DNA fusion vaccines against B-cell tumors. *Trends Mol Med* 7:566-572.

Zitelli JA, Brown CD and Hanusa BH. 1997. Surgical margins for excision of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 37:422-429.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Victor Hugo Montoya Urzúa

Candidato para el grado de
Maestro en Ciencias con acentuación en Inmunobiología

Tesis: Evaluación del efecto antitumoral de la combinación de una vacuna de ADN contra WT1 y GEM en un modelo murino de melanoma.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Datos personales: Nacido en Gómez Palacio, Durango, el 13 de marzo de 1982. Hijo del señor Avelino Montoya Carrillo y de la señora Leticia Urzúa Salas.

Educación: Egresado en julio de 2006 de la carrera de Biología por parte de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.